

# **PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LIMBO OCULAR EN HUMANOS**

**MODALIDAD: EXPLORATORIO**

**MARIA BELÉN SALAZAR PIEDRAHITA**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera biomédica**

**Carolina Londoño Peláez Ing, MsC, PhD  
Directora del trabajo de grado**



**UNIVERSIDAD EIA - UNIVERSIDAD CES  
INGENIERÍA BIOMÉDICA  
ENVIGADO  
2016**

A mis seres queridos: familia, amigos, y en especial a mi madre. Quien con su nobleza y amor inquebrantables me ha llevado de su mano para que aprenda a construir la mejor versión de mí misma y para que luche por aquello que amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Carolina Londoño Peláez, por su guía y acompañamiento incondicional en tan ardua labor. Porque, llena de comprensión y paciencia, siempre supo desde su experiencia cómo ayudarme a construir esta investigación con firmeza, pero con amor.

Al Dr. Luis Fernando Mejía por la iniciativa del proyecto y la toma de las biopsias. De igual modo, al Grupo de Oftalmología del CES por su interés y compromiso con esta investigación.

A Diego Velásquez Puerta y a todo el personal del Laboratorio de Biotecnología en Salud del CES, por estar siempre prestos a orientarme en mi llegada al laboratorio.

Al convenio de Ingeniería Biomédica EIA-CES por aportar las bases académicas y los recursos financieros para la realización de este proyecto de investigación.

# TABLA DE CONTENIDO

1	Preliminares.....	12
1.1	Planteamiento del problema .....	12
1.2	Hipótesis.....	12
1.3	Objetivos del proyecto .....	12
1.3.1	Objetivo general .....	12
1.3.2	Objetivos específicos.....	12
1.4	Marco de referencia.....	12
1.4.1	El ojo.....	12
1.4.2	La córnea: anatomía y fisiología.....	14
1.4.3	Limbo ocular: histología y estructura.....	17
1.4.4	Células madre progenitoras del limbo ocular (LESCs) .....	20
1.4.5	Composición de la matriz extracelular limbar (ECM, Extracellular Matrix) .....	22
1.4.6	Células madre.....	23
1.4.6.1	Clasificación de las células madre.....	24
1.4.6.2	Células madre del limbo ocular.....	25
1.4.6.2.1	Proliferación y migración .....	26
1.4.7	Deficiencia en células del limbo .....	28
1.4.8	Potencial de las células madre del limbo en el tratamiento de enfermedades oculares 29	
1.4.8.1	El futuro de la regeneración de córnea .....	30
2	Metodología.....	32
2.1	Obtención de la muestra.....	32
2.2	Procesamiento de la muestra y cultivo celular .....	32
2.3	Expansión de las células .....	34

3	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
4	CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES .....	44
5	Bibliografía .....	45
	ANEXOS .....	52
	ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	52
	ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	53
	PBS (solución 1X).....	53
	L-Glutamina (solución stock de 200 mM).....	53
	EGF ( <i>Epidermal Growth Factor</i> ) recombinante humano (solución stock 20 µg/ml) ...	54
	Insulina recombinante humana (solución stock 2,000X; 10 mg/ml).....	54
	Protocolo para la elaboración del medio de crecimiento de epitelio corneal (HCE)...	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de las condiciones de procesamiento de la totalidad de las muestras.

Se toma el día de obtención/pase como el día 0. .... 33

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del ojo humano. Tomado de: (Ball, 2014). .....	13
Figura 2. Histología de la córnea. Compuesta por células endoteliales (que conforman el endotelio corneal), fibrillas de colágeno (que conforman la capa estromal media), células basales, aladas y escamosas (que conforman la capa epitelial). Adaptado de: (Ginel Gascon, 2008; Secker & Daniels, 2009). .....	15
Figura 3. Identificación de las palisades de Vogt y criptas limbares. Tomado de: (Dziasko & Daniels, 2016). .....	18
Figura 4. Características anatómicas e histológicas del epitelio limbar humano. (A) Se muestran secciones tangenciales de las Palisades de Vogt (POV) y criptas limbares (LC) (Dua et al., 2005; Shortt et al., 2007). (B) Las denominadas criptas epiteliales limbares (LEC) aparecen como extensiones del epitelio limbar al estroma limbar. (C) Las LEC se desprenden del limbo como una agrupación sólida de células. Tomado de: (Dziasko & Daniels, 2016). .....	19
Figura 5. Localización de las células madre del estroma limbar. Tinción de PAX6 (rojo) y ABCG2 (verde). Las flechas indican la localización de las palisades de Vogt. La barra blanca representa 50 µm. Tomado de: (Du, Funderburgh, Mann, SundarRaj, & Funderburgh, 2005). .....	20
Figura 6. Contacto entre LESC y células estromales en las LCs. En rosado: núcleo celular. En naranja: área de interacción. Técnica: Serial block-face scanning electron microscopy (SBFSEM). Tomado de: (Dziasko et al., 2014).....	21
Figura 7. Diagrama compuesto que muestra vista lateral del ojo y una sección transversal zonal del ojo con tipos de célula y la hipótesis X, Y, Z. Las células madre limbares se encargan de repoblar la córnea proliferándose en el epitelio basal (X) y dando lugar a células de amplificación transitoria. Estas células hacen migración centripeta (Y) y dan lugar a células terminalmente diferenciadas que eventualmente migran y mueren naturalmente en la superficie central de la córnea (Z). 'X + Y = Z'. Tomado de: (Osei-Bempong, Figueiredo, & Lako, 2013). .....	27
Figura 8. División simétrica y asimétrica de las LECs. Tomado de: (Secker & Daniels, 2009). .....	28
Figura 9. Procesado preliminar de la muestra. A. Toma de muestra por parte del equipo médico, B. Lavado y precipitado preliminar de la muestra de tejido. ....	35
Figura 10. Cultivo de células del limbo ocular. A. Ilustra el crecimiento de las células en la periferia del tejido disgregado. B. Expansión de las células en cultivo. ....	36
Figura 11. Tejidos disgregados en proceso de expansión.....	37
Figura 12. Procesamiento, cultivo y expansión de la muestra de limbo ocular. A, B. Inicio de la migración celular (día 2 de cultivo). C, D. Proliferación masiva de células de forma circular, lo que se entiende como las células de amplificación transitoria o TACs, las primeras que se dan a partir de las LECs. .	38
Figura 13. Ciclo de vida de la muestra sin disgregar en trozos más pequeños. A. Día 13: el explante está suspendido en el medio y no se observa crecimiento de células en la periferia. B. Día 22: Se observa proliferación celular. C. Día 33: al realizar un pase del cultivo a otro plato se pierde la adhesión de las células y de la muestra. ....	39
Figura 14. Dispersión de las células en cultivo en las primeras etapas de crecimiento. ....	40
Figura 15. Expansión de las células en cultivo. Muestra en cultivo en el día 13. Para este día el cultivo ya tenía la suficiente confluencia como para ser trasplantado, si ese fuera el caso. ....	41
Figura 16. Cultivo y expansión de las células reportadas en la bibliografía. C. Proliferación de las células migrando hacia la periferia de la muestra en los días 2-3. E. Monocapa confluyente de células en los 10 días de cultivo. G. Crecimiento no uniforme de las células. H. Explante en el que ya solo hay crecimiento de fibroblastos. I. En este punto el tejido solo es de queratinocitos estromales. Obtenido de: (Mariappan et al., 2010). ....	42

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	51
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	52



## RESUMEN

Las células madre del limbo ocular, que son las precursoras de la córnea, se encuentran en la unión entre la conjuntiva y la esclera y son fundamentales para el mantenimiento del epitelio corneal ante lesiones, mantienen la transparencia de la córnea, y participan en la homeóstasis ocular. En condiciones normales, una vez las células madre del limbo ocular son activadas, migran desde el limbo hacia el centro de la córnea y ayudan en la regeneración tisular. Entre las enfermedades oculares más comunes se encuentra la enfermedad o deficiencia limbar, una de las causas más importantes de la opacidad corneal, que puede conllevar a la disminución o pérdida de la visión. Estos pacientes no son candidatos para el trasplante de córnea convencional y si preexiste vascularización corneal e inflamación, el riesgo de rechazo en estos pacientes se incrementa. En pacientes adultos, son varios los factores que pueden llevar a la deficiencia limbar: lesiones inmunológicas, químicas, térmicas, o por rayos ultravioleta u otras radiaciones ionizantes. Dentro de las opciones terapéuticas, la terapia celular ha ganado popularidad en términos de reconstrucción de superficie ocular y de regeneración visual, minimizando el requerimiento de tejido donante y permitiendo la recolección de las células del propio paciente mediante procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos. Esta fuente presenta ventajas significativas para el tratamiento de enfermedades oculares debido a que son células autólogas, lo que disminuye el riesgo de rechazo por inmunidad. Con el objetivo de identificar una terapia celular para la enfermedad limbar se realizó esta investigación en la que se realiza la obtención y expansión de células epiteliales del limbo ocular. Se encontró que tanto la disgregación del tejido como el tiempo de crecimiento para lograr la adhesión son fundamentales para una expansión de las células. Los resultados, en correspondencia con los que muestra la literatura, mostraron que aproximadamente dos semanas después las células alcanzan un nivel de proliferación óptimo. La evaluación de los resultados fue visual, a través de microscopía óptica, y llevando registro fotográfico de los resultados. A partir de esto, y comparando con la literatura disponible se pudo reconocer la presencia de células madre pero se sugiere que para llevar más lejos esta investigación se realice una caracterización más detallada de los cultivos. Estos estudios potencian el descubrimiento y la posterior implementación de terapias celulares para controlar el desarrollo temprano de dichas enfermedades e incluso evitarlo.

**Palabras clave:** células madre, limbo ocular, deficiencia limbar, cultivo celular, terapia celular, medicina regenerativa.

## ABSTRACT

Limbal Stem Cells which are the precursors of the cornea, are located at the junction between the conjunctiva and sclera and have an essential role in maintaining the corneal epithelium when there is an injury. They maintain transparency of the cornea and participate in ocular homeostasis. Under normal conditions, once the ocular limbal stem cells are activated, they migrate from the limbus to the center of the cornea and help in tissue regeneration. Among the most common eye diseases there is the Limbal Stem Cell Deficiency, one of the most important causes of corneal opacity, which can lead to low or lost vision. Patients who suffer from this illness are not eligible for a conventional cornea transplant, given that they only present corneal transient amplifying cells which have a short life span; at the same time, the risk of transplant rejection increases if there is a preexistent corneal vascularization and/or inflammation. In adult patients, there are several factors that can lead to limbal deficiency: immunological, chemical or thermic injuries, ultraviolet rays or other ionizing radiations. Amongst the therapeutic options, cell therapy has gained popularity in terms of ocular surface reconstruction and visual regeneration, minimizing the requirement for donor tissue and allowing the collection of the patient's own cells with minimally invasive surgical procedures. This source has significant advantages for the treatment of eye diseases because they are autologous cells, reducing the risk of rejection immunity. Aiming to identify a suitable cell therapy for this disease, this research project was done by obtaining and expanding limbal epithelial cells. It was found that both the mincing of the tissue and the time of adhesion promotion of the explant to the surface are essential for cell expansion. The results, in accordance with the literature, showed that approximately after two weeks of culture the cells reach an optimal level of proliferation. The evaluation of the results was visual, through optical microscopy and photographic record of results. From this, and compared to the available literature, it was possible to recognize the presence of stem cells but it is strongly suggested to make a more detailed and strict characterization to take this research further. These studies enhance the discovery and subsequent implementation of cellular therapies to control the early development of these diseases and even prevent it.

**Keywords:** stem cells, corneal limbus, limbal stem cell deficiency, cell culture, cell therapy.

## INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Deficiencia Limbar, relacionada con la deficiencia de células madre del limbo ocular, es una de las causas más importantes en pacientes con opacidad de la córnea y finalmente pérdida de la visión. La córnea tiene el 75% del poder dióptrico del ojo, y por eso la importancia de su correcto funcionamiento para el mantenimiento de una buena visión. Pacientes con deficiencias limbares sufren frecuentemente disminución de la visión y, generalmente, no son candidatos para el trasplante de córnea convencional.

En pacientes adultos, son varios los factores que pueden llevar a la enfermedad o deficiencia de LSC (LSC deficiency, LSCD), como lesiones inmunológicas, químicas, térmicas, o por rayos ultravioleta u otras radiaciones ionizantes. Hasta hace poco, estas afectaciones se manejaban mediante procedimientos quirúrgicos como el trasplante de HAM o mediante biopsia de tejido limbar sano. Sin embargo, el trasplante de cultivo in vitro de células madre autólogas del limbo ha ganado popularidad a pasos agigantados en términos de reconstrucción de superficie ocular y de regeneración visual.

El uso de las células madre (stem cells, SCs) ha pasado de ser un concepto de interés científico, principalmente en el campo de la biología del desarrollo, a ocupar un lugar importante en la comunidad en general, a nivel de medicina regenerativa, al demostrar ser una opción prometedora para resolver innumerables casos clínicos que en un principio carecían de tratamientos (Polak, 2009).

# 1 PRELIMINARES

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de las células madre del limbo ocular (CMLO) en el mantenimiento de la superficie del epitelio corneal y a la alta contribución de los trasplantes al tratamiento de deficiencias en dicho tejido, se requiere la descripción de un protocolo para la obtención de CMLO, a partir del ojo sano, y la identificación del potencial terapéutico de estas células madre.

## 1.2 HIPÓTESIS

Es posible obtener células madre de limbo ocular a partir de biopsias de tejido limbar para su posterior aplicación en el tratamiento de enfermedades oculares.

## 1.3 OBJETIVOS DEL PROYECTO

### 1.3.1 Objetivo general

Obtener células madre del limbo ocular para una potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades oculares.

### 1.3.2 Objetivos específicos

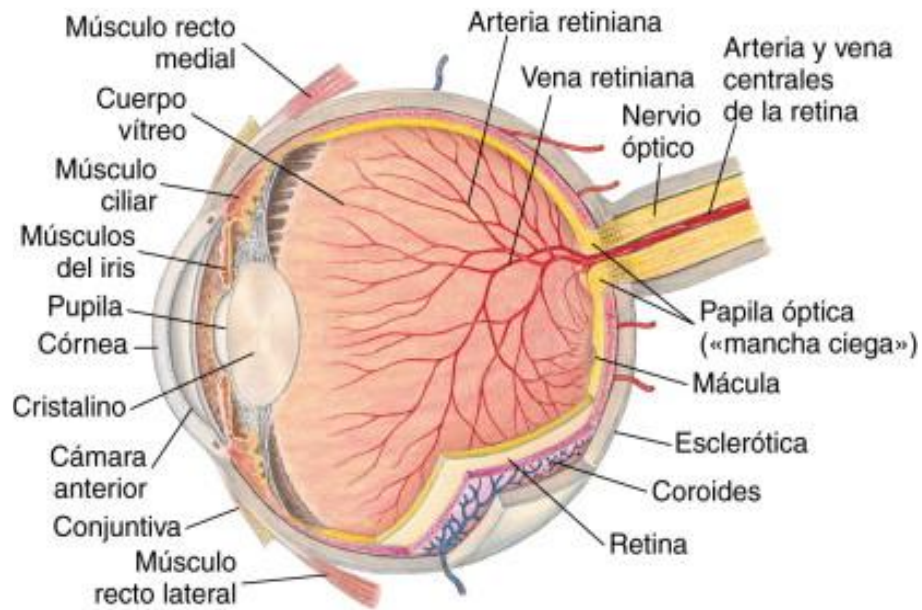
- o Obtener células madre del limbo ocular.
- o Cultivar y expandir las células madre del limbo ocular.
- o Identificar el potencial de las células madre del limbo en el tratamiento de enfermedades oculares.

## 1.4 MARCO DE REFERENCIA

### 1.4.1 EL OJO

El ojo es el órgano sensorial que transmite los estímulos visuales al cerebro para que los interprete (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Es el órgano fotosensible del cuerpo: la luz pasa a través de la córnea, el cristalino y varias estructuras refractivas del ojo; a continuación se enfoca por el cristalino en la porción fotosensible de la túnica neural del ojo, la retina, que contiene los bastones y conos fotosensibles. A través de una serie de varias capas de células nerviosas y de sostén se transmite la información visual por el nervio óptico al cerebro para su procesamiento (Gartner & Hiatt, 2001).

Con un total de 24 mm de diámetro aproximadamente, ocupa la cavidad orbitaria de la que solo está expuesta su superficie anterior. El ojo es una extensión embriológica directa del encéfalo (Ball, 2014).



**Figura 1. Anatomía del ojo humano.** Tomado de: (Ball, 2014).

El bulbo del ojo se integra con tres túnicas o capas: una túnica fibrosa, que forma la capa externa fuerte del ojo; una túnica vascular, la capa media pigmentada y vascular; y una túnica neural, la retina, que constituye la capa más interna. La túnica fibrosa externa del ojo se divide en esclerótica y córnea. La esclerótica opaca y blanca recubre las cinco sextas partes posteriores del ojo, en tanto que la córnea transparente e incolora cubre su sexto anterior (Gartner & Hiatt, 2001).

La esclerótica está casi desprovista de vasos sanguíneos. Es una capa de tejido conectivo fibroso duro que consiste en haces de colágeno tipo I entrelazados, alternados con redes de fibras elásticas; esta disposición confiere la forma del ojo, que se conserva por la presión intraocular del humor acuoso (localizado adelante del cristalino) y el cuerpo vítreo (situado atrás del cristalino) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Los fibroblastos localizados en el tejido conectivo de la esclerótica son células planas y alargadas. En las regiones profundas de la esclerótica se hallan melanocitos. En la capa superficial de tejido conectivo denso de la esclerótica se insertan los tendones de los músculos extraoculares; esta capa está envuelta por la cápsula de Tenon, una vaina fascial que recubre el nervio óptico y el ojo adelante hasta la región ciliar. Esta vaina, que separa el ojo de la grasa periorbitaria, está unida a la esclerótica por una capa delgada de tejido conectivo laxo llamada epiesclerótica (Gartner & Hiatt, 2001).

#### 1.4.2 LA CÓRNEA: ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

La córnea es una estructura compleja que, además de cumplir una misión protectora, es responsable de tres cuartas partes de la potencia óptica del ojo. La córnea representa el sexto anterior del globo ocular y se continúa con la esclerótica. El humor acuoso posterior y las lágrimas anteriormente se encargan de abastecer la córnea de nutrientes y de retirar los productos metabólicos (Bowling, 2015). Además, la zona periférica de la córnea recibe oxígeno desde la circulación del limbo (American Academy of Ophthalmology (AAO), 2013).

La córnea es el tejido corporal con mayor densidad nerviosa, por lo que trastornos como las abrasiones y la queratopatía bullosa se asocian a intenso dolor, fotofobia y lagrimeo (Bowling, 2015). Posee una sensibilidad que es cien veces mayor a la de la conjuntiva. En la córnea existen dos plexos nerviosos, uno subepitelial y otro estromal profundo, innervados ambos por la primera división del trigémino. La córnea posee un poder refractivo mayor que el del cristalino (Welsch, 2008), debido a esto, debe estar libre de vasos sanguíneos y de cualquier tipo de opacidad; porque al lesionarse aparece cicatrización que conlleva opacidad y deterioro de la visión. Cuando la visión se afecta significativamente, se recomienda realizar un trasplante de córnea con la finalidad de restaurar su transparencia. El procedimiento se realiza utilizando el centro de la misma (8,5 mm de un total de 12,0 mm de diámetro de una córnea normal) (Mejía, 2014). Dicho trasplante es una de las técnicas quirúrgicas más antiguas de la oftalmología y el hecho de que sea un tejido avascular le confiere una gran ventaja respecto a otros órganos trasplantados, porque sus consecuencias son locales y en general pueden ser manejadas de forma adecuada con el uso de colirios inmunosupresores (Garralda et al., 2006).

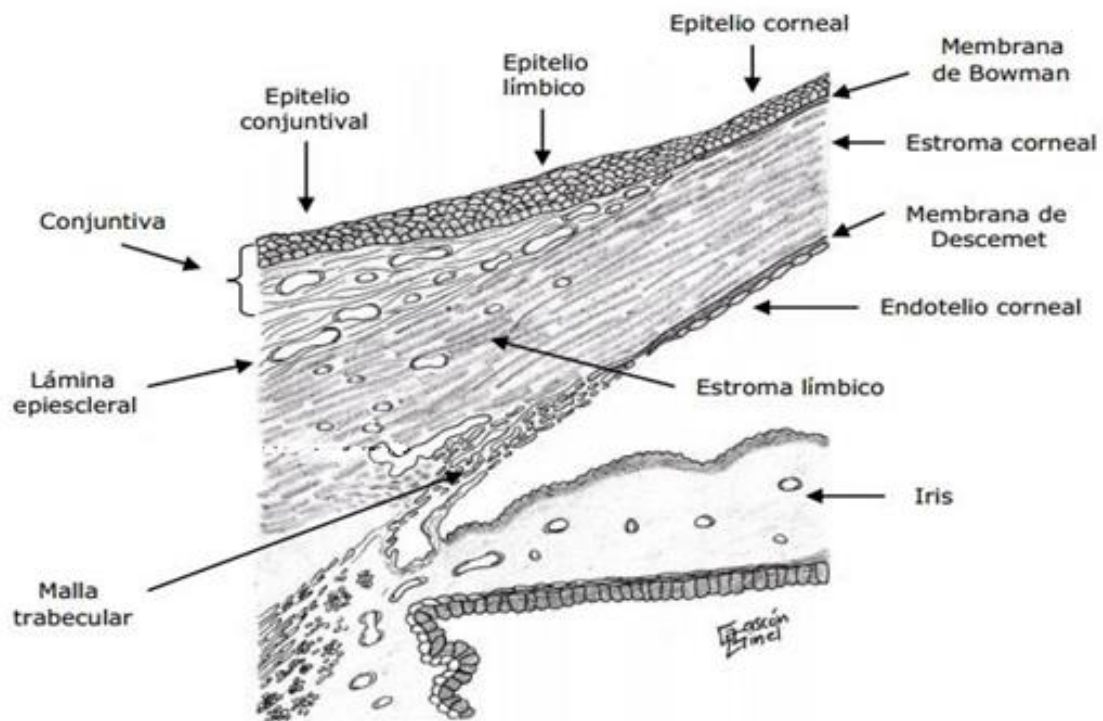
El diámetro corneal medio es de 11,5 mm verticalmente y 12 mm horizontalmente. Su espesor central tiene un promedio de 540  $\mu\text{m}$ , siendo más grueso hacia la periferia. El espesor corneal central varía según las personas e influye decisivamente en la medición de la presión intraocular (PIO) con técnicas convencionales (Bowling, 2015).

A nivel histológico, la córnea está compuesta por cinco capas (Figura 2), desde la más externa a la más interna se encuentran:

- **Epitelio corneal:** es un epitelio que supone alrededor del 5% (0,5 mm) del grosor total de la córnea (American Academy of Ophthalmology (AAO), 2012); (Welsch, 2008); (Ross & Pawlina, 2007). El epitelio corneal cumple funciones ópticas (transparencia y fuerte poder refractivo), de protección física de traumas externos, como barrera a los fluidos externos y a los microorganismos y como estabilizador de la lágrima (a través de las microvellosidades que son prolongaciones membranosas digitiformes propias de ciertas células, entre ellas las epiteliales) (Villa & Santodomingo, 2009).

El epitelio corneal es un tejido que presenta una alta tasa de regeneración en donde las células de la superficie se liberan constantemente de manera que presentan un periodo de rotación de 4-6 días. Además el epitelio corneal esta permanente expuesto a lesiones debido a que está expuesta al entorno. El epitelio consta de varias capas de células, con un grosor promedio de tres a cinco células, y formado por:

- Células superficiales: son las células más externas. Se encuentran incrementadas por la presencia de micropliegues y microvellosidades, facilitan la adhesión de la película lagrimal y la mucina. Después de un ciclo vital de pocos días, las células superficiales se desprenden a la lágrima.
- Dos o tres capas de células aladas.
- Células basales: consiste en una capa única de células basales columnares, cilíndricas proximales, ancladas mediante hemidesmosomas a la membrana basal subyacente. Son las células encargadas de la mitosis.



**Figura 2. Histología de la córnea.** Compuesta por células endoteliales (que conforman el endotelio corneal), fibrillas de colágeno (que conforman la capa estromal media), células basales, aladas y escamosas (que conforman la capa epitelial). Adaptado de: (Ginel Gascon, 2008; Secker & Daniels, 2009).

- **Membrana de Bowman:** llamada también membrana basal anterior. Se constituye como una membrana acelular formada por fibras de colágeno tipo I organizadas de forma irregular, lo que se le presupone una función de resistencia que se convierte en el refuerzo mecánico protector del estroma (Bowling, 2015). Tiene un espesor medio de 8 a 12  $\mu\text{m}$ , rica en poros que son atravesados por axones sensitivos procedentes del plexo nervioso estromal (Ginel Gascon, 2008).
- **Estroma corneal:** es la capa estromal media y corresponde al 90% del grosor total de la córnea (Bowling, 2015). Consiste en laminillas alternadas de fibroblastos modificados dispersos (queratinocitos), fibrillas de colágeno orientadas regularmente y separadas por proteoglicanos (sulfato de condroitina y sulfato de queratano) (Ross & Pawlina, 2007). El mantenimiento de esta disposición ordenada y de los espacios entre las fibras de colágeno es esencial para la transparencia corneal (Secker & Daniels, 2009).
- **Membrana de Descemet:** es una lámina individualizada que actúa como monocapa de células endoteliales, con un fino entramado de fibrillas de colágeno de un tipo diferente al del estroma; que a su vez transportan nutrientes del humor acuoso para el estroma y bombean el exceso de agua, manteniendo una hidratación óptima y evitando el edema corneal (Secker & Daniels, 2009). La membrana consta de una zona anterior con bandas y una zona posterior sin bandas que va siendo formada a lo largo de la vida por el endotelio y actúa como una membrana basal modificada. Tiene una alta elasticidad, capacidad de regeneración (Bowling, 2015) y resistencia ante enzimas proteolíticas (Ginel Gascon, 2008).
- **Endotelio corneal:** el endotelio está compuesto por una monocapa de células poligonales ricas en mitocondrias (Welsch, 2008), estas células son responsables del transporte de solutos y de fluidos entre los compartimientos acuoso y estromal. Las células endoteliales mantienen la córnea parcialmente deshidratada, bombeando el exceso de líquido fuera del estroma. El endotelio corneal es irrigado por humor acuoso. La densidad celular en los adultos jóvenes es de aproximadamente 3.000 células/ $\text{mm}^2$ . El número de células disminuye a un ritmo de alrededor del 0,6% anualmente, y las células adyacentes aumentan de tamaño para rellenar los espacios, ya que las células endoteliales no pueden regenerarse, lo que tiene un fuerte impacto en la regulación de los fluidos. La lesión de esta capa conduce a la tumefacción o hinchazón corneana y puede causar la pérdida temporal o permanente de la transparencia (Ross & Pawlina, 2007).



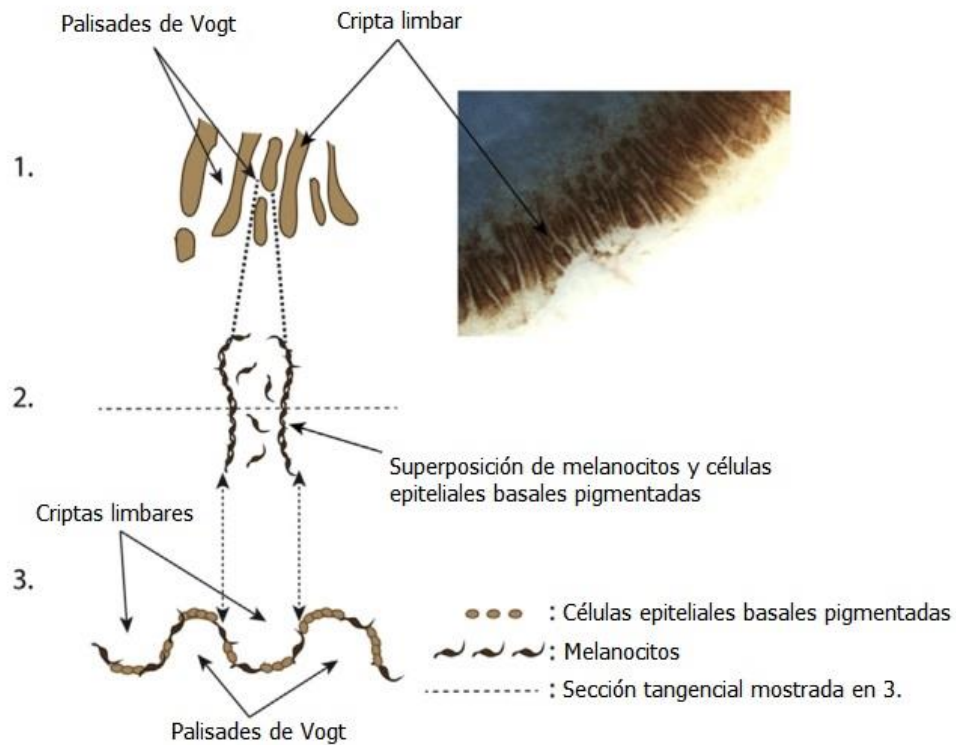
Recientemente se ha propuesto la existencia de una sexta capa corneal entre el estroma y la membrana de Descemet, aunque algunos autores creen que se trata de una continuación del estroma posterior que ya había sido descrita previamente (Bowling, 2015). Existe una zona de transición entre el epitelio corneal y el conjuntival denominada limbo; en esta zona el epitelio consta de más de diez capas de células, siendo el más grueso de toda la superficie ocular y donde existen unas células precursoras, que son las células madre (SCs *Stem Cells*) y que son la fuente de regeneración de las células epiteliales corneales (Rodríguez Martín et al., 2003).

#### **1.4.3 LIMBO OCULAR: HISTOLOGÍA Y ESTRUCTURA**

El limbo es una zona circular, semitransparente, de coloración grisácea, ligeramente sobreelevada, que corresponde a la línea de transición entre la córnea y la esclera. Ambos tejidos contribuyen a su estructura formada únicamente por dos capas (epitelio y estroma) y abundantes vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. El limbo ocular tiene especial importancia porque es el lugar por donde drena el humor acuoso y porque sus vasos, junto con este último, se encargan de nutrir la córnea.

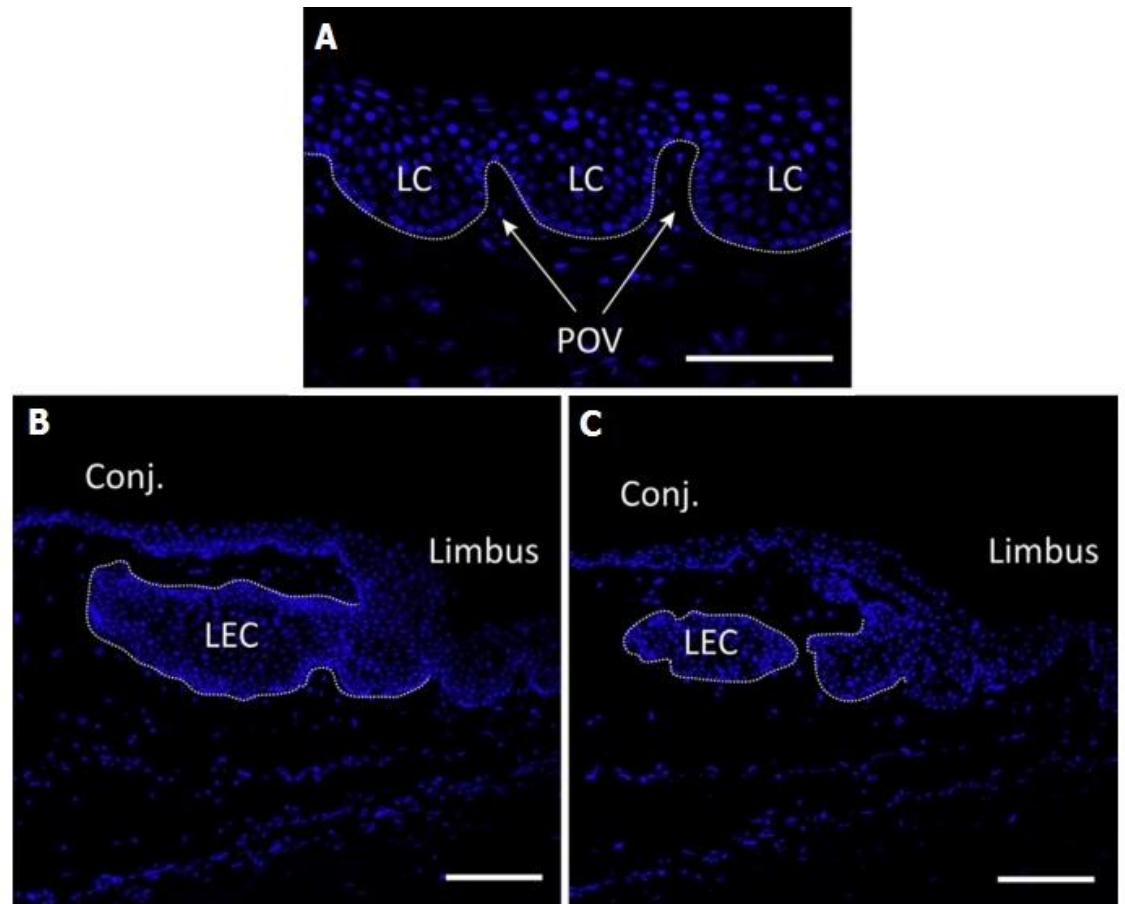
En la superficie ocular, el limbo constituye la transición entre dos epitelios, el de la conjuntiva y el de la córnea. El limbo se encuentra formado por una capa epitelial que contiene entre ocho y doce hileras de células cuboidales escamosas no estratificadas, que contienen un citoplasma menos abundante que el de las células de la córnea y que se adentran en el interior de la matriz estromal adyacente. La capa estromal del limbo está formada, además de por fibras de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, por diversos tipos de células tales como melanocitos, macrófagos, mastocitos, linfocitos, células plasmáticas, así como por vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas de tipo amielínico.

El limbo ocular está caracterizado por invaginaciones estromales, estrías o surcos radiales, llamadas Palisades de Vogt (Dziasko & Daniels, 2016), que se constituye en un nicho específico y regulado que por sus propiedades funcionales y anatómicas mantiene el linaje epitelial de los precursores en un estado inactivo (Dziasko & Daniels, 2016) (Shortt et al., 2007) (Figura 3). Las palisades de Vogt son identificables por su concentración de células que contienen melanina y melanocitos limbares, además están constituidos por factores solubles secretados, una composición específica de la matriz extracelular, propiedades biomecánicas e interacciones con nichos celulares circundantes (Dziasko & Daniels, 2016).



**Figura 3. Identificación de las palisades de Vogt y criptas limbares.** Tomado de: (Dziasko & Daniels, 2016).

Estudios recientes, mediante microscopía electrónica de barrido en biopsias limbares descelularizadas, identificaron que el estroma limbar encierra las criptas limbares lateralmente (Figura 4). Adicionalmente, mediante técnicas inmunohistoquímicas se destaca la presencia de un plexo vascular complejo que está íntimamente asociado con las crestas limbares. El estroma limbal que rodea las crestas limbares es muy vascularizado y contiene una alta población de células estromales (Dziasko & Daniels, 2016) (Figura 4).



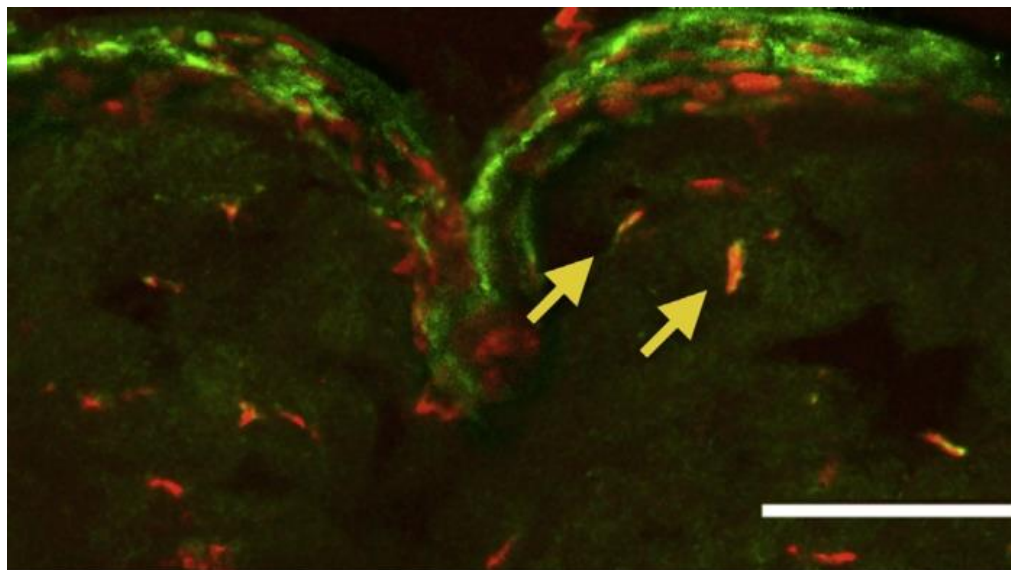
**Figura 4. Características anatómicas e histológicas del epitelio limbar humano.** (A) Se muestran secciones tangenciales de las Palisades de Vogt (POV) y criptas limbares (LC) (Dua et al., 2005; Shortt et al., 2007). (B) Las denominadas criptas epiteliales limbares (LEC) aparecen como extensiones del epitelio limbar al estroma limbar. (C) Las LEC se desprenden del limbo como una agrupación sólida de células. Tomado de: (Dziasko & Daniels, 2016).

El epitelio de la córnea está sujeto a un constante proceso de renovación y regeneración donde las capas más superficiales se descaman continuamente y han de ser remplazadas por otras nuevas. Estos mecanismos de reparación, tanto en circunstancias fisiológicas como patológicas, no provienen de la división mitótica de células basales del centro de la córnea sino de las localizadas en la región del limbo, específicamente en los Palisades de Vogt, debido al rico soporte vascular local y a la pigmentación perilímbica, que protege a las células de la radiación solar; cuando hay una herida corneal la localización de esta «barrera celular» evita que las células conjuntivales invadan la córnea para repararla (Rodríguez Martín, y otros, 2003). Las propiedades de las células basales del centro de la córnea son análogas a las células madre (CM, o SC, *stem cells*) identificadas en otras

regiones del cuerpo humano. Estas células madre progenitoras del epitelio limbar están localizadas principalmente en los cuadrantes superior e inferior (Shortt et al., 2007); y existe una variación por regiones de la distribución de nichos celulares.

#### 1.4.4 CÉLULAS MADRE PROGENITORAS DEL LIMBO OCULAR (LESCs)

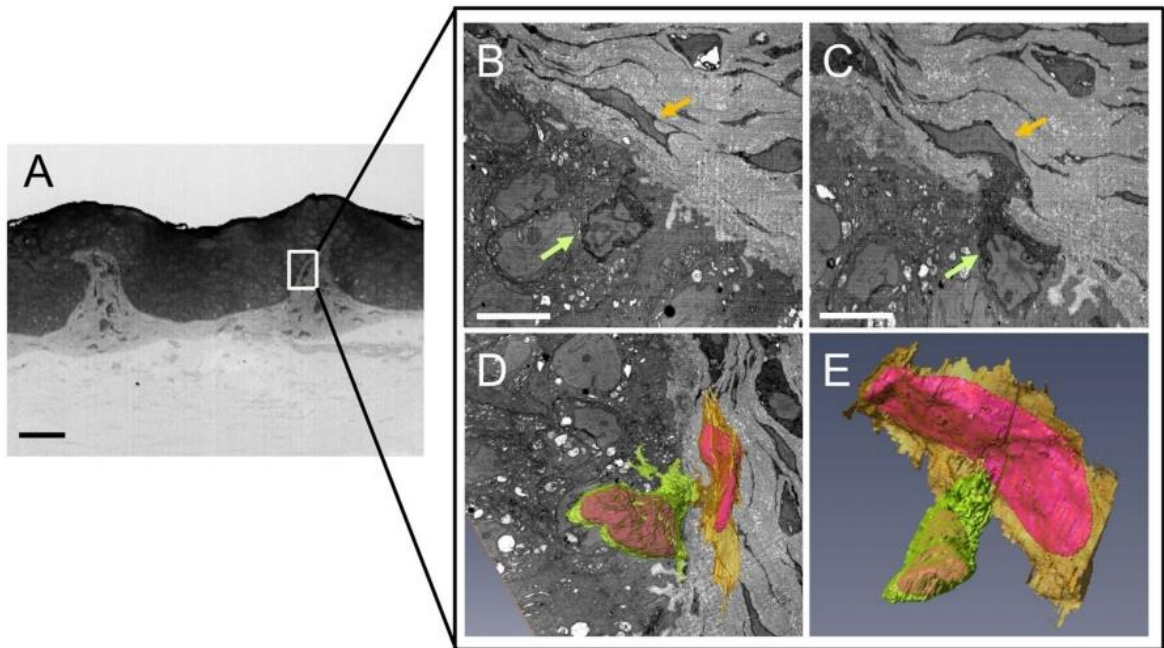
El estroma corneal contiene una población de células mesenquimales subyacente a la membrana basal limbar con características propias de las células madre adultas. Dichas células apoyan la viabilidad de las células madre epiteliales del limbo (LESCs), la población de principal interés en el presente proyecto. En el cultivo, por sí solas, estas células del nicho muestran un fenotipo típico de células madre mesenquimales pero, en general, exhiben un potencial de diferenciación hacia diversos tipos de células, incluyendo los queratocitos, proporcionando así una fuente abundante de estas células para aplicaciones experimentales y de ingeniería biomédica (Funderburgh, Funderburgh, & Du, 2016). Las células estromales son importantes también porque han demostrado la capacidad de remodelar el tejido estromal, suprimir la inflamación y restaurar la transparencia. Debido a que se pueden obtener mediante biopsia, ofrecen un potencial para el tratamiento de opacidad estromal. Fueron originalmente observadas con inmunotinción de las proteínas ABCG2 y PAX6 (Funderburgh et al., 2016) (Figura 5).



**Figura 5. Localización de las células madre del estroma limbar.** Tinción de PAX6 (rojo) y ABCG2 (verde). Las flechas indican la localización de las palisades de Vogt. La barra blanca representa 50  $\mu\text{m}$ . Tomado de: (Du, Funderburgh, Mann, SundarRaj, & Funderburgh, 2005).

Las células madre mesenquimales (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*) son poblaciones pequeñas de células madre adultas identificables en muchos tejidos no epiteliales que comparten varias propiedades similares, como el crecimiento clonal, la diferenciación multipotencial, y la auto-renovación (Funderburgh et al., 2016). Su presencia en el estroma limbar se confirmó en estudios donde por inmunotinción de secciones de córnea se vio que estas células expresaban CD90 y CD105, marcadores típicos de las MSC (Mathews et al., 2015). En el caso del estroma limbar, están las denominadas células madre del estroma corneal (CSCCs, Corneal Stromal Stem Cells) (Funderburgh et al., 2016).

Se han realizado exploraciones para describir la asociación entre LESC y células estromales y en ellas se mostraron prolongaciones de estas últimas extendidas a través de fenestraciones en la membrana basal epitelial (Figura 6), haciendo contacto con las células epiteliales basales (Dziasko et al., 2014). También se han comparado las MSCs con células CSSC en términos de su crecimiento clonal, la expresión de genes de células madre, la formación de esferas, y la capacidad de diferenciarse en queratinocitos funcionales. Esto mostró que, *in vitro*, el nicho celular de células mesenquimales no era distinto de las CSCs (Basu et al., 2014).



**Figura 6. Contacto entre LESC y células estromales en las LCs.** En rosado: núcleo celular. En naranja: área de interacción. Técnica: Serial block-face scanning electron microscopy (SBFSEM). Tomado de: (Dziasko et al., 2014).

Como la mayoría de las poblaciones de MSC, las CSSCs exhiben un amplio potencial de diferenciación. La diferenciación de linajes celulares distintos demuestra multipotencia de CSSCs, un identificador de clave de las células madre. Este tipo de células mostró un crecimiento clonal, multipotencialidad, y expresión de un conjunto de marcadores de la superficie celular distinta a los marcadores de las LESC (Du et al., 2005).

Varios estudios evidencian que, *in vivo*, las CSSCs proporcionan un sistema de soporte biológico para el mantenimiento de la población activa de LSCs en el nicho limbar en el que ambos tipos de células residen (Ainscough, Linn, Barnard, Schwab, & Harkin, 2011; Bray et al., 2016; Chen, Hayashida, Chen, Xie, & Tseng, 2010; Hashmani et al., 2013; Huang et al., 2015; Katikireddy, Dana, & Jurkunas, 2014; Li, Zhu, Xie, Chen, & Tseng, 2012; Xie, Chen, Li, & Tseng, 2011). Estos estudios y la proximidad anatómica de estas dos poblaciones celulares proporcionan evidencia convincente de que el principal rol de las CSSCs *in vivo* es el mantenimiento homeostático de las LESC en el nicho limbar. El potencial de las CSSCs para mediar la respuesta inmune y para iniciar la regeneración estromal sugieren otros posibles roles en el nicho.

#### **1.4.5 COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR LIMBAR (ECM, EXTRACELLULAR MATRIX)**

Se han hecho caracterizaciones de los diferentes componentes de la ECM expresados en el limbo, y la información resultante sugiere que esos componentes que son parte del nicho celular tienen un papel importante en la homeostasis de LSCs. La ECM provee soporte estructural y mecánico, apoya la adhesión celular, transduce señales a las células a través de la unión a receptores de membrana, proporciona la resistencia mecánica y el espacio de amortiguación para el tejido, sirve como medio para la comunicación intercelular y regulación de funciones celulares como migración, proliferación, autorrenovación y diferenciación. Una optimización de sus componentes puede ayudar a recrear un nicho *ex vivo* para expansión de células madre limbares con propósitos terapéuticos y para ello se requiere más investigación sobre el rol preciso de cada componente en la regulación de las células madre limbares (Mei, Gonzalez, & Deng, 2012).

Una de las proteínas de mayor expresión es la *vitronectina*, una glicoproteína altamente expresada en la membrana basal del limbo, pero no en la córnea central ni la conjuntiva. Se encontró que células limbares basales expandidas en placas recubiertas con vitronectina tenían la capacidad de generar grandes colonias con alto potencial de crecimiento similares y presentaban una mayor eficiencia de expansión en comparación con placas no recubiertas (Echevarria, Chow, Watson, Wakefield, & Di Girolamo, 2011).

Otras, como la *fibronectina*, no tienen reportes de su función específica en LSCs, pero sus roles potenciales en otras poblaciones de células madre han sido investigados y comprenden la mediación y promoción de la adhesión y migración celular (hallado en células madre de médula ósea) (Espana et al., 2003). La fibronectina está ubicada por toda la ECM, preferentemente expresada en la base del epitelio en limbo adulto y córnea fetal. Su forma insoluble es sintetizada por fibroblastos y células epiteliales (Mei et al., 2012).

La presencia de colágeno también ha mostrado ser un componente esencial de la membrana basal epitelial, partiendo de que es la proteína más abundante en mamíferos (25-30% del total de proteína del organismo) (Dziasko & Daniels, 2016). En las células madre del limbo, algunas pruebas *in vitro* han indicado que dichas células se unen preferentemente al colágeno IV, el cual se ha utilizado para enriquecer la población de células madre del limbo ocular; la rápida adhesión mostró un fenotipo menos diferenciado (Mei, Nakatsu, Baclagon, & Deng, 2014). Por otra parte, el colágeno IV ha demostrado servir como sustrato para inducir la diferenciación de células madre embrionarias en células epiteliales (Homma et al., 2004).

#### **1.4.6 CÉLULAS MADRE**

En términos generales, las células madre tienen el potencial de convertirse en muchos tipos de células diferentes en el cuerpo durante la vida temprana y el crecimiento. Además, en muchos tejidos sirven como un sistema de reparación interna, dividiéndose sin límite para reponer otras células. Cuando una célula se divide, cada nueva célula tiene el potencial, ya sea para permanecer una célula madre o convertirse en otro tipo de célula con una función más especializada (Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. , 2016).

Mientras se mantenga homeostasis su ciclo de división es lento, pero cuando ocurre una lesión pueden volverse altamente proliferativas (Cotsarelis et al., 1989; Lavker and Sun, 2003; Lehreret al., 1998). Para repoblar el nicho, tienen la capacidad de dividirse asimétricamente (Figura 8).

Estas células gozan del concepto de jerarquía proliferativa: algunas se pueden dividir sin madurar y otras se dividen y maduran, además tienen la potencialidad de expresión promiscua de genes y patrones múltiples de transcripción, es decir que pueden proliferar indefinidamente en forma clonal con un bajo índice de errores genéticos. Otra característica es la plasticidad para adaptarse a entornos diferentes y modificar su expresión genética para desarrollar estirpes celulares distintas, propias del tejido donde se encuentran. Dentro de los epitelios conjuntival y limbar se ha demostrado la presencia de SCs que se definen como células indiferenciadas o poco diferenciadas que tienen dos propiedades

fundamentales: la capacidad de autoregenerarse y la de diferenciarse en uno o más tipos celulares (Scorsetti, 2014).

En un amplio sentido la caracterización de células madre se realiza mediante la identificación de genes expresados y no expresados propios de estas células, siendo algunos de ellos: proteínas nucleares (p63), receptores de membrana (factor de crecimiento epidérmico, CD71), proteínas de la membrana celular (CD34, CD133, CD117), citoquinas (integrina  $\beta 1$ ,  $\alpha 6, \alpha 9$ , CCR4 (CC quemoquina receptor), transportadores de resistencia a drogas (ABCG2/BCRP) y proteínas citoplasmáticas (nestina, vimentina, citoqueratinas (CK) entre otros (Mei et al., 2012).

#### **1.4.6.1 CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE**

Las células madre se pueden clasificar según su plasticidad, es decir, su capacidad de diferenciación. Diferentes tipos de células madre varían en su grado de plasticidad, o la versatilidad del desarrollo. Dichas categorías incluyen:

**Totipotentes:** El más versátil de los tipos de células madre. Cuando un espermatozoide y un óvulo se unen, forman un huevo fertilizado de una sola célula. Esta célula es totipotente, lo que significa que tiene el potencial para dar lugar a cualquier y todas las células humanas, tales como las células del cerebro, el hígado, la sangre o del corazón, o incluso dar lugar a un organismo funcional completo. Las primeras divisiones celulares en el desarrollo embrionario producen más células totipotentes. Después de cuatro días de la división celular embrionario, las células comienzan a especializarse en células madre pluripotentes (Fortier, 2005).

**Pluripotentes:** Estas células, como las totipotentes, pueden dar lugar a todos los tipos de tejidos. Sin embargo, no pueden dar lugar a un organismo completo. En el cuarto día de desarrollo, el embrión se forma en dos capas, una capa externa que se convertirá en la placenta, y una masa interior que formarán los tejidos del cuerpo humano en desarrollo. Estas células internas, aunque pueden formar casi cualquier tejido humano, no pueden hacerlo sin la capa exterior; por lo que no son totipotentes, sino pluripotentes. A medida que estas células madre pluripotentes continúan dividiéndose, comienzan a especializarse aún más (Fortier, 2005).

**Multipotentes:** Estas son las de menor plasticidad. Dan lugar a una gama limitada de las células dentro de un tipo de tejido. La descendencia de las células pluripotentes se convierte en los progenitores de líneas celulares tales como células sanguíneas, células de la piel y células nerviosas. En esta etapa, son multipotentes. Pueden llegar a ser uno de varios tipos de células dentro de un órgano determinado. Por ejemplo, las células madre de la sangre



multipotentes pueden desarrollar en las células rojas de la sangre, células blancas de la sangre o plaquetas (Fortier, 2005).

**Adultas:** Una célula madre adulta es una célula madre pluripotente en humanos adultos que se utiliza para reemplazar las células que han muerto o perdido su función. Es una célula indiferenciada presente en el tejido diferenciado. Se renueva y puede especializarse para producir todos los tipos de células presentes en el tejido del que se originó. Hasta el momento se han identificado células madre adultas para muchos tipos diferentes de tejidos tales como hematopoyético (sangre), neuronal, endotelial, músculo, mesenquimal, gastrointestinales y las células epidérmicas (Fortier, 2005).

Así como en diferentes tejidos la renovación a lo largo de la vida se hace necesaria por lesiones o por desgaste normal, el epitelio corneal no es la excepción, ya que en él células escamosas muertas se desprenden constantemente durante el parpadeo para mantener la transparencia de la córnea y por ende su funcionalidad (Secker & Daniels, 2009). Las células madre limbares (LSCs, *Limbal Stem Cells*) comparten características comunes con otras células madre somáticas adultas. Algunas de ellas son su pequeño tamaño (Romano et al., 2003), alta relación núcleo/citoplasma (Barrandon and Green, 1987) y ausencia de expresión de marcadores de diferenciación como citoqueratinas 3 y 12 (Kurpakus et al., 1990; Schermer et al., 1986). Presentan un ciclo celular lento, mayor capacidad proliferativa in vivo e in vitro, no contienen queratinas específicas del epitelio corneal y la lista de sus identificadores es extensa y se amplía constantemente en la búsqueda de especificidad (Rodríguez Martín et al., 2003).

#### **1.4.6.2 CÉLULAS MADRE DEL LIMBO OCULAR**

Numerosos informes han dado soporte al modelo de células madre limbares (LSC). Debido a la falta de un marcador específico de estas células, la localización de las LSC se ha basado en una serie de criterios, que se aplican también a otros tipos de SC.

Los progenitores epiteliales in vitro son pequeños y circulares, caracterizados por un alto ratio núcleo-citoplasma y la generación de colonias hacinadas de células epiteliales (Arpitha, Prajna, Srinivasan, & Muthukkaruppan, 2005; Barrandon & Green, 1987). Estas células se mantienen en un estado de reposo durante la homeostasis normal de la córnea (Pellegrini et al., 1999), es decir, se caracterizan por un bajo nivel de diferenciación con un fenotipo primitivo. De hecho, datos inmunohistoquímicos han sugerido que las células basales del limbo tienen el nivel más bajo de diferenciación entre todas las células epiteliales de la córnea. En particular, se observó que ambas citoqueratinas K3 y K12, marcadores específicos para el fenotipo epitelial corneal, no se expresaron en células

epiteliales basales limbares (Kurpakus, Stock, & Jones, 1990; Schermer, Galvin, & Sun, 1986).

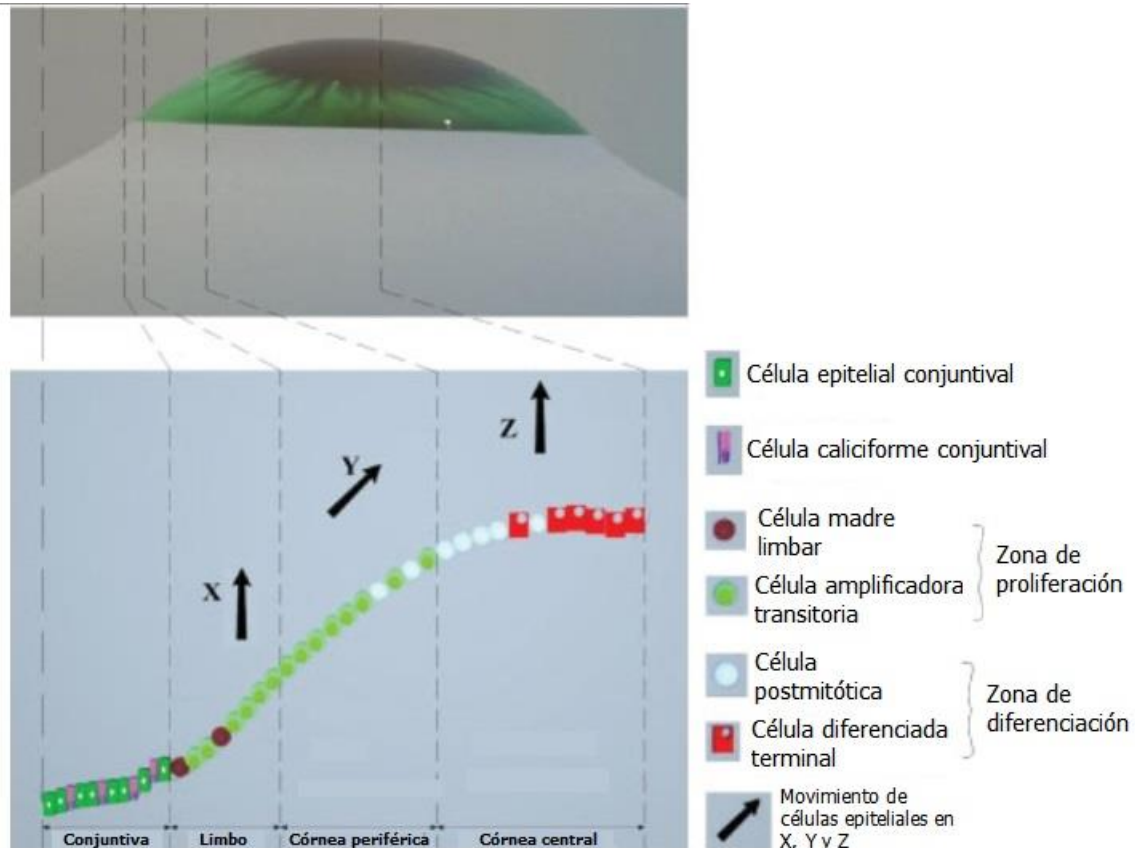
Además del bajo nivel de diferenciación también está el ciclo celular lento y la capacidad de retener los precursores de ADN marcado durante un período prolongado, característica estudiada en diferentes modelos animales (Cotsarelis, Cheng, Dong, Sun, & Lavker, 1989; Lavker et al., 1991; Lehrer, Sun, & Lavker, 1998; S. C. Tseng & Zhang, 1995).

Ante una herida se genera un alto potencial de proliferación. Lo mismo pasa en condiciones de cultivo *in vitro*. Ambas condiciones se han estudiado, teniendo en cuenta también la presencia de agentes inductores de diferenciación, fortaleciendo aún más el concepto de la presencia de las células progenitoras epiteliales en la córnea (Cotsarelis et al., 1989; Ebato, Friend, & Thoft, 1988; Hernandez Galindo, Theiss, Steuhl, & Meller, 2003; Kruse & Tseng, 1994; Lavker et al., 1991; Lehrer et al., 1998; Lindberg, Brown, Chaves, Kenyon, & Rheinwald, 1993; S. C. Tseng & Zhang, 1995). Específicamente, a partir de estudios que evaluaban la cicatrización de heridas del epitelio corneal cuando el epitelio limbal había sido eliminado, y a partir de los primeros trasplantes utilizados para reconstituir la totalidad del epitelio corneal en casos de lesión de la superficie ocular (Kenyon & Tseng, 1989; Tsai, Sun, & Tseng, 1990).

#### **1.4.6.2.1 PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN**

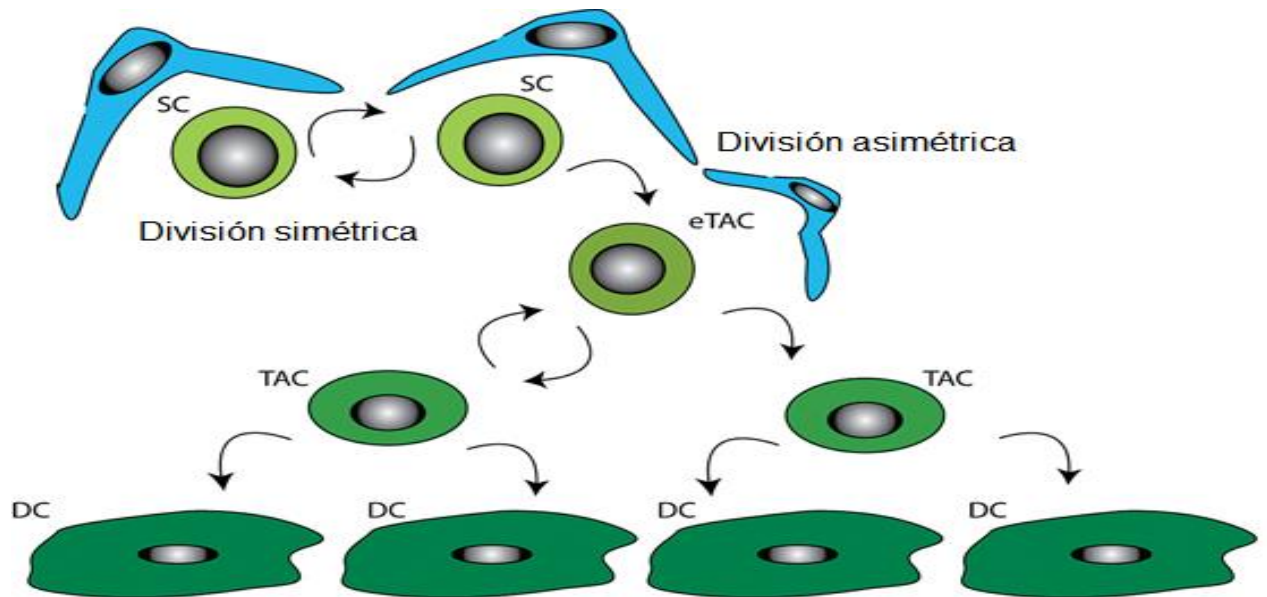
La integridad de la córnea, y por tanto su función, dependen de las propiedades de auto-renovación del epitelio corneal. La explicación de este fenómeno de continuo remplazo de las células epiteliales se denomina como “Hipótesis X, Y, Z” y está descrita como un movimiento neto de las células del epitelio basal limbar (X) sumado al movimiento neto de migración centripeta de células epiteliales en la córnea (Y). La suma de estos dos es igual a las células que se desprenden en la córnea central (Z), dando la ecuación  $X + Y = Z$  (Figura 7) (Thoft et al., 1983).

La descendencia inmediata de las células madre que migran fuera del nicho o cripta limbar (LC) tiene el potencial de proliferar rápidamente y proporcionar la capacidad de rápida expansión del número de células que sea necesario. Estas células se denominan células de amplificación transitoria (TAC, *Transient Amplifying Cells*) (Dua, Shanmuganathan, Powell-Richards, Tighe, & Joseph, 2005). Las LSCs también crean una barrera física y previenen la migración epitelial conjuntival hacia la superficie corneal gracias a un suministro continuo de células basales (que son de vida larga) y a la migración centripeta de TAC (de vida corta) (Rodríguez Martín, y otros, 2003).



**Figura 7. Diagrama compuesto que muestra vista lateral del ojo y una sección transversal zonal del ojo con tipos de célula y la hipótesis X, Y, Z.** Las células madre limbares se encargan de repoblar la córnea proliferándose en el epitelio basal (X) y dando lugar a células de amplificación transitoria. Estas células hacen migración centripeta (Y) y dan lugar a células terminalmente diferenciadas que eventualmente migran y mueren naturalmente en la superficie central de la córnea (Z). 'X + Y = Z'. Tomado de: (Osei-Bempong, Figueiredo, & Lako, 2013).

Las TACs se producen en el epitelio basal del limbo y la periferia de la córnea. Las células diferenciadas constituyen las capas suprabasal y superficial (Schlötzer-Schrehardt & Kruse, 2005). Se cree que cuando las LESC hacen división asimétrica (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) producen una célula madre y una célula amplificadora transitoria temprana (eTAC, Early Transient Amplifying Cell). Mientras la célula madre permanece en el nicho para repoblarlo, la eTAC es capaz de continuar la división dando lugar a TACs para finalmente llegar a la producción de células terminalmente diferenciadas (DC). Las flechas dobles (Figura 8) representan la capacidad de autorrenovación de las SCs. Las células de apoyo (azul) rodean las células madre (verde) (Secker & Daniels, 2009).



**Figura 8. División simétrica y asimétrica de las LECs.** Tomado de: (Secker & Daniels, 2009).

Todas las células dentro de la LEC son epiteliales por naturaleza, como se demostró por tinción de CK14 (Dua et al., 2005). La tinción de ABCG2 fue más densa dentro de la población de células LEC y se extendió a lo largo de las células basales y no tanto a lo largo de las células basales de la conjuntiva adyacente. Si las células dentro de la LEC estaban en la parte inferior del esquema de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, las células epiteliales basales en la parte superior, dicha distribución tal sería lo natural y esperado (Dua et al., 2005).

#### 1.4.7 DEFICIENCIA EN CÉLULAS DEL LIMBO

Como se ha mencionado previamente, la ausencia o lesión de estas células primordiales pueden ocasionar una alteración de la capacidad regenerativa del epitelio de la córnea, deficiencia que se asocia a una respuesta de tipo reparativo por parte del epitelio conjuntival. Cuando el epitelio de la conjuntiva crece sobre la superficie de la córnea éste experimenta una transformación morfológica hacia epitelio corneal (sin alcanzar su verdadero fenotipo), es más fino y contiene células caliciformes. Este proceso conocido como conjuntivalización cursa con la aparición de vascularización superficial, la destrucción de la membrana basal (lo que favorece la aparición de defectos cicatriciales del epitelio) y

la presencia de una inflamación crónica. Como resultado estos pacientes presentan una fotofobia severa y una agudeza visual a menudo comprometida.

La LSCD se caracteriza principalmente por el daño o disfunción de las LSC con una consecuente invasión por parte del epitelio conjuntival en la córnea (Osei-Bempong, Figueiredo, & Lako, 2013). La etiología de la LSCD varía, se puede clasificar en congénita y adquirida. Enfermedades congénitas causantes incluyen; aniridia, queratitis asociada con la deficiencia endocrina múltiple, disqueratosis congénita, y displasia epidérmica. La aniridia es un trastorno congénito en el que se presenta anormalidad del nicho de LSC y no puede sostener la proliferación y diferenciación de las LSCs. En la disqueratosis congénita, el defecto en las células madre es causada principalmente por una deficiencia de la telomerasa. En la mayoría de los LSCS adquiridos, es probable que ambas LSCs y su nicho se ven afectados (Sejpal, Ali, et al., 2013).

Algunas de las causas adquiridas más comunes son:

- Quemaduras químicas y térmicas.
- Cirugías oculares que involucran la región limbar.
- Uso de lentes de contacto: microtraumas crónicos mecánicos por el contacto, hipoxia, o irritación provocada por la solución para lentes.
- Enfermedades inflamatorias de la superficie ocular como síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide de la membrana mucosa (PMM), queratoconjuntivitis vernal (KCJV) severa crónica, o infecciones microbiales que involucran el limbo.
- La radioterapia y la toxicidad de los medicamentos tópicos tales como la mitomicina C y 5-FU pueden destruir directamente las células madre y su nicho.

El proceso de conjuntivalización es característico de la LSCD (Nakamura et al., 2006). Hay otros signos involucrados, como la infiltración de células caliciformes, neovascularización de la córnea, y defectos epiteliales persistentes y cicatrices (H S Dua & Forrester, 1990). Como consecuencia, la LSCD culmina en la discapacidad visual y dolor persistente en pacientes (H S Dua, Joseph, Shanmuganathan, & Jones, 2003). Se clasifica como parcial o total, y unilateral o bilateral (H S Dua, Saini, Azuara-Blanco, & Gupta, 2000). Si el área de la pupila está cubierta por epitelio conjuntival o hay dolor ocular significativo, debe llevarse a cabo la intervención (Limeng, Dan, Jia, & David, 2014).

#### **1.4.8 POTENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE DEL LIMBO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES OCULARES**

Las opciones más conservadoras de tratamiento incluyen lubricación intensiva, lágrimas artificiales, lentes de contacto terapéuticos y gotas de suero autólogo (Geerling, MacLennan, & Hartwig, 2004; Zhao & Ma, 2015).

Cabe señalar que el trasplante de córnea (que incluye la parte central pero no el limbo) no es una opción en el caso de la LSCD ya que aun con eso sigue siendo necesaria la presencia de células madre limbares que reemplacen el epitelio que recubre el injerto corneal (Harminder S Dua & Azuara-Blanco, 2000; Zhao & Ma, 2015).

Cuando la LSCD es total, es necesario trasplantar una población de LSCs autólogas o alogénicas una vez se tenga un fenotipo estable de epitelio corneal (Zhao & Ma, 2015). A pesar de que aún está por determinarse la duración a largo plazo de los efectos de estos injertos, estos hallazgos son un importante avance en el campo de la bioingeniería de superficie ocular para el tratamiento de pacientes con enfermedad ocular severa (Nakamura et al., 2006).

En el caso de los tejidos alogénicos el paciente puede recaer en la patología si hay destrucción inmunológica del trasplante; hay una alta incidencia de rechazo en estos casos gracias a las numerosas células de Langerhans y antígenos HLA-DR (Harminder S Dua & Azuara-Blanco, 2000), por eso se debe recurrir a la inmunosupresión.

La identificación de estas células gracias a los marcadores específicos, la biopsia con diferentes fuentes de obtención y las mejoras en las técnicas, sustratos y los sistemas de medios de cultivos han facilitado la apertura de nuevos horizontes en el tratamiento de pacientes (Pineda Molina & Giraldo Hoyos, Comparación de fuentes de células madre adultas: eficiencia de proliferación y potencial de diferenciación, 2012).

#### **1.4.8.1 EL FUTURO DE LA REGENERACIÓN DE CÓRNEA**

Con la incorporación de nuevos conocimientos y la mejor comprensión acerca de los nichos de células madre y su función, se han desarrollado técnicas de expansión *ex vivo* a partir de la extracción de pequeñas biopsias de tejido limbar para su posterior trasplante. Los trasplantes de células cultivadas de limbo, mucosa bucal y conjuntiva, publicados por diferentes autores en los últimos años, han alcanzado una tasa de éxito superior al 70% para reconstruir la superficie ocular con seguimientos de 36 meses como promedio (Scorsetti, 2014). En la actualidad, los protocolos más investigados en bioingeniería de la córnea y terapia de células madre corneales se basan en el uso de productos de origen animal y/o células humanas alogénicas (Gaddipati et al., 2014); tales productos plantean riesgos potenciales, tales como la enfermedad de injerto contra huésped, cataratas, ojo seco, glaucoma, así como enfermedades transmitidas por los animales, pero ante eso, un nuevo método de cultivo para expandir células epiteliales del limbo humano en HAM *ex vivo* ha sido desarrollado utilizando un medio de cultivo con suero humano autólogo como suplemento de crecimiento individual (Limeng, Dan, Jia, & David, 2014).

En comparación con el medio complejo de uso común incluyendo FBS y otros productos derivados no humanos, la omisión de ingredientes xenogénicos puede reducir la inmunogenicidad de host del tejido trasplantado y también proteger contra la transmisión entre especies (Gaddipati et al., 2014). Se requiere una optimización adicional para mejorar los procedimientos y protocolos de manipulación ex vivo para garantizar la calidad del trasplante de células. (Limeng, Dan, Jia, & David, 2014)

También se requiere una mayor comprensión de las señales moleculares que constituyen el nicho de células madre del limbo. Al mismo tiempo, teniendo en cuenta que la tasa de éxito reportada difiere ampliamente entre los estudios y depende de varios parámetros, incluyendo las fuentes de los tejidos y las indicaciones para la cirugía/patología ocular concomitante, tiene una garantía de criterios bien definidos y estrictos para aclarar más y evaluar los métodos de trasplante y los resultados terapéuticos entre los estudios prospectivos (Limeng, Dan, Jia, & David, 2014). En resumen, a pesar de que se necesita con urgencia adquirir más conocimiento sobre las fuentes potenciales de células adecuadas, material de soporte, y los factores de crecimiento, los avances en la investigación básica y los tratamientos clínicos indican que hay una gran esperanza para las terapias basadas en células madre para la regeneración de la córnea en el futuro cercano.

## **2 METODOLOGÍA**

### **2.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras de biopsias frescas contralaterales de tejido limbar fueron obtenidas de pacientes que se sometieron a cirugía de biopsia limbar. De acuerdo con las consideraciones establecidas por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos de la Universidad CES, a las personas se les informó sobre el procedimiento que se iba a realizar con las muestras y se les hizo firmar un consentimiento informado (Anexo 1) en el que se explicaba el objetivo del proyecto y en el que se reconocía que se cumplía con determinados criterios.

El procedimiento quirúrgico consistió en realizar una incisión en la conjuntiva del ojo, 3 mm detrás del limbo (preferiblemente a las 12 en punto para biopsia contralateral) y disecando hacia el limbo superficialmente y en la córnea hasta 1 mm. Esto utilizando una cuchilla N°.15 en un mango Bard-Parker. La conjuntiva debe ser extirpada del limbo justo detrás de la línea pigmentada (Palisades de Vogt), preservando el tejido limbal con 1 mm de córnea clara (Mariappan et al., 2010) y sus dimensiones mínimas corresponden a 2 x 2 mm<sup>2</sup>, según lo registrado en previos estudios (Mariappan et al., 2010; Zhao & Ma, 2015).

Las biopsias fueron inmediatamente transferidas por separado a tubos tipo Falcon de 15 ml con 10 ml de solución buffer fosfato (PBS, Sigma) suplementado con antibióticos (anfotericina B, penicilina y estreptomicina; Sigma) y transportadas al Laboratorio de Biotecnología en Salud del CES a 4°C.

### **2.2 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y CULTIVO CELULAR**

En total fueron procesadas seis muestras, con algunas variaciones en los tiempos de incubación y la disgregación de las mismas (Tabla 1). La primera biopsia se procesó dos horas después de la obtención, la muestra fue colocada en un plato de Petri estéril y lavado dos veces con PBS para retirar restos de sangre de la cirugía y extracción de la muestra. Posteriormente, se procedió a la disgregación en trozos más finos de aproximadamente 0,4 a 0,5 mm con una cuchilla quirúrgica estéril N°21 para facilitar la separación entre el limbo y la esclera (Tomasello, Musso, & Cillino, 2016a).

Los trozos obtenidos se transfirieron a una nueva caja de Petri, donde se adicionaron algunas gotas de medio de cultivo de crecimiento de epitelio corneal (HCE) (1,99 g de medio mínimo esencial (MEM, Sigma); 3,33 g de Ham's F12 (Sigma); 0,01 mg/L de factor de crecimiento epidérmico EGF (Sigma); 0,01 mg/L de toxina cólica (Sigma); 0,69 g de



bicarbonato de sodio (Sigma) sobre los trozos y se incubaron a 5% de CO<sub>2</sub> humidificado y a 37°C durante una hora para promover la adhesión de los explantes sobre la superficie del plato. Después de la incubación se añadió el resto de medio de HCE suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma), 1% de antibiótico (anfotericina B, penicilina y estreptomicina; Sigma) hasta completar 10 ml y se incubó nuevamente a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub> humidificado durante 50 días en total.

La segunda biopsia se procesó dos horas después de la obtención, se lavó dos veces con PBS sobre un plato de Petri y fue cultivado sin previa disgregación en un frasco de cultivo T-25 con algunas gotas de medio HCE para promover adhesión. Luego de una incubación de 30 minutos se añadió el resto de medio de cultivo HCE suplementado con 10% FBS y 1% de antibiótico hasta completar 5 ml. Si incubó en las mismas condiciones de la primera muestra.

La tercera biopsia se procesó 30 horas después de obtenida y a excepción del tiempo de procesamiento, los pasos fueron los mismos que para la primera muestra. La cuarta biopsia se procesó seis horas después de la obtención, con los mismos pasos de la primera y tercera muestra. La quinta y sexta biopsia fueron procesadas simultáneamente, a las veinticuatro horas y llevando el mismo proceso de las muestras 1, 3 y 4.

**Tabla 1: Resumen de las condiciones de procesamiento de la totalidad de las muestras. Se toma el día de obtención/pase como el día 0.**

N° de muestra	Tiempo entre obtención y procesamiento	Tejido disgregado	Tamaño del plato	Tiempo de promoción de adhesión	Números de pases
1	2 hr	Sí	Petri de 10 cm	1 hr	2
2	2 hr	No	T25	30 min	2
3	30 hr	Sí	P6	20 min	1
4	6 hr	Sí	P6	18 hr	1
5	24 hr	Sí	Petri pequeño 5 cm	1 hr	Ninguno
6	24 hr	Sí	Petri pequeño 5 cm	1 hr	Ninguno

### **2.3 EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS**

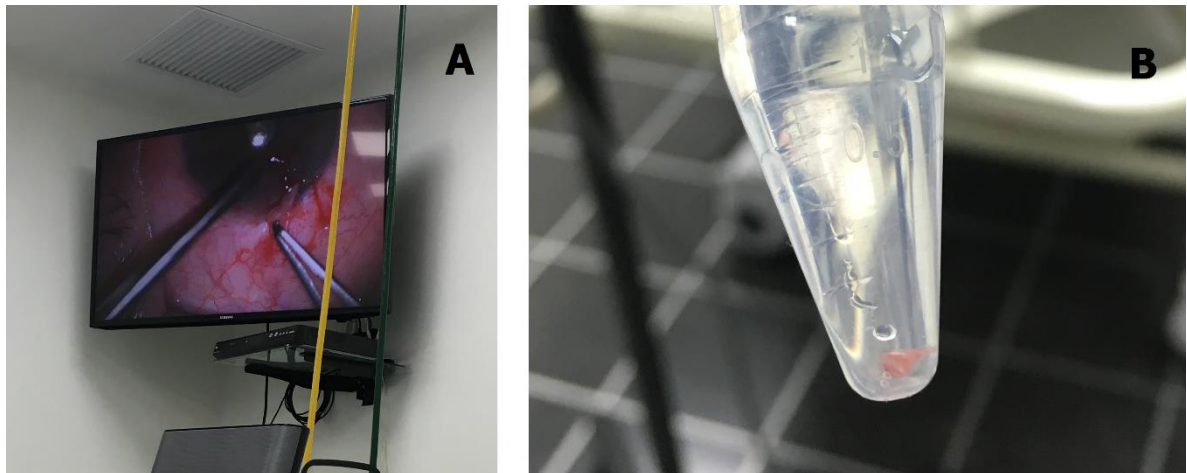
De acuerdo al tiempo de cultivo, para algunas de las muestras se realizaron uno o dos pases. Para ello se empezó aspirando el medio presente y haciendo un lavado con PBS. Antes de hacer la tripsinización los explantes fueron retirados por separado con pinzas y ubicados en el plato de destino para que se fueran adhiriendo. Para despegar las células restantes, se añadió tripsina y se incubó por diez minutos para resuspenderlo en 6mL de medio y centrifugar a 1200 rpm por 5 min. Finalmente se añadió al plato aproximadamente el 50% de las células que se habían centrifugado.

A lo largo del procesamiento y cultivo de las muestras se realizó documentación fotográfica de las mismas mediante microscopía óptica (Nikon). Todo esto para conocer su evaluación y determinar la presencia de células madre.

### 3 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

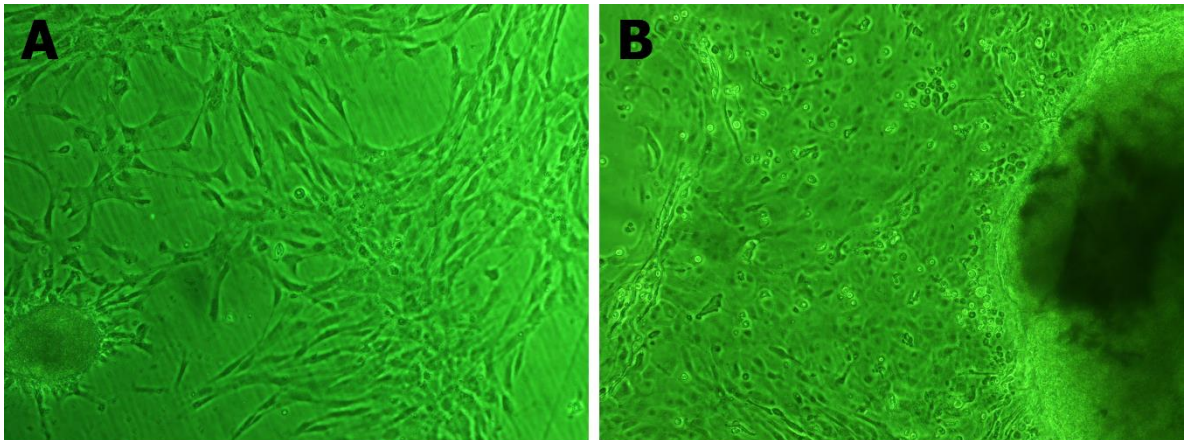
La parte experimental del presente trabajo se enfoca en comprobar la posibilidad de obtener células madre de limbo ocular a partir de biopsias de tejido limbar para su posterior aplicación en el tratamiento de enfermedades oculares. Diversos autores han desarrollado protocolos de expansión de LESC's, con algunas variaciones en aspectos de los reactivos y medios tales como el medio de cultivo y sus componentes (diferente concentración de SFB; ausencia o presencia de factores tales como el crecimiento epidérmico, insulina, toxina colérica; suplementos de crecimiento corneal, entre otros); el procesamiento (por disociación (suspensión) o mediante explante, El co-cultivo de la muestra con células 3T3, y la inclusión de sustratos como soporte de crecimiento de las células, dentro de los cuales se menciona el soporte de membrana amniótica humana (hAM, Human Amniotic Membrane) (Chen, Mahabole, & Tseng, 2013; S. C. G. Tseng, Chen, Shen, Chen, & Hu, 2010).

El proceso de obtención de la muestra, se realizó de manera cuidadosa por parte de los médicos oftalmólogos, siguiendo el protocolo previamente presentado. Las muestras fueron almacenadas y transportadas a 4°C en condiciones de bioseguridad hasta el Laboratorio de Biotecnología en Salud del CES de Sabaneta, en donde el primer paso fundamental del proceso se constituyó el lavado de la muestra en PBS y la centrifugación cuidadosa del tejido (Figura 9).



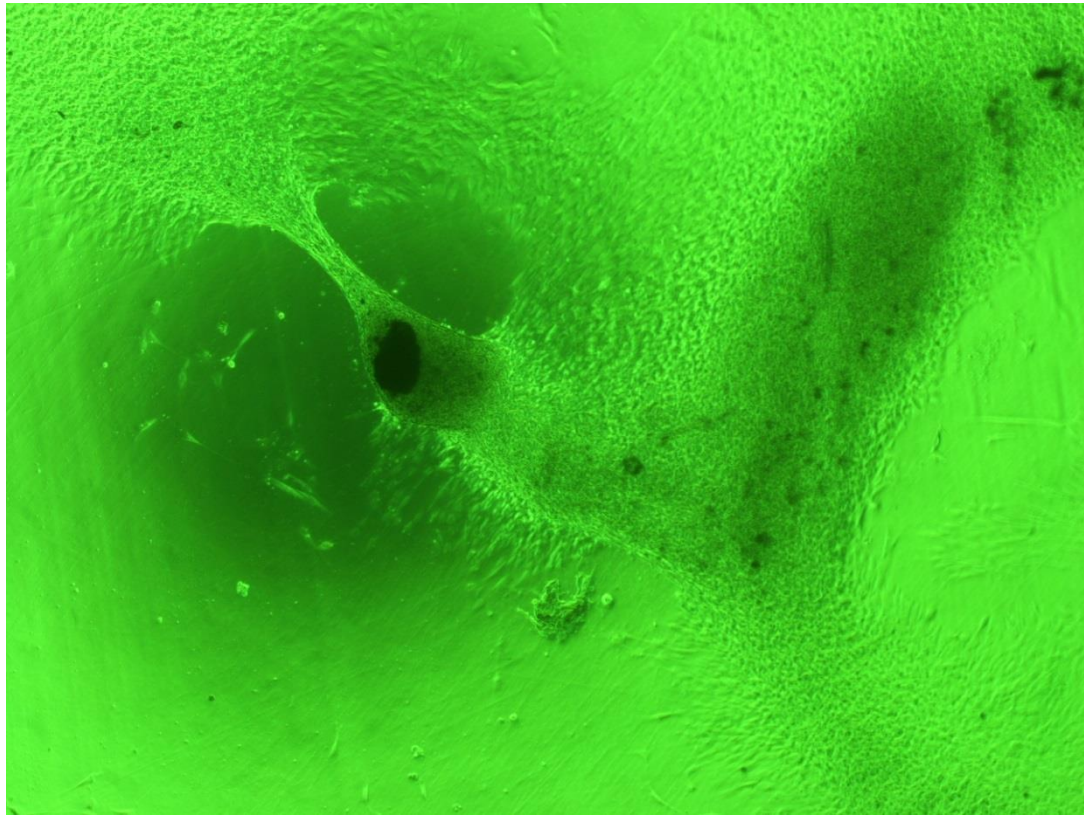
**Figura 9. Procesado preliminar de la muestra. A.** Toma de muestra por parte del equipo médico, **B.** Lavado y precipitado preliminar de la muestra de tejido.

Durante el procesamiento de las muestras se encontró que los tejidos frescos tienen un mayor potencial de crecimiento que aquellos fueron procesados horas después de la toma de la muestra (Figura 10). Esto es acorde con lo reportado por otros investigadores, en donde el potencial de crecimiento de las células incrementa en las muestras de pacientes procesadas en las primeras horas de toma en comparación con las muestras provenientes de pacientes cadavéricos (Mariappan et al., 2010). En algunos reportes se señala que aquellas muestras almacenadas a temperatura ambiente, refrigeradas o en nitrógeno líquido son tan buenas como las biopsias frescas (Chaudhuri & Vanathi, 2012) pero en este caso todas las muestras provenían de pacientes vivos. Los autores recomiendan que el tiempo de procesamiento de la muestra no supere las 48 horas, incrementando la capacidad de crecimiento cuando la muestra es procesada en las primeras horas de toma de la muestra.



**Figura 10. Cultivo de células del limbo ocular.** A. Ilustra el crecimiento de las células en la periferia del tejido disgregado. B. Expansión de las células en cultivo.

En concordancia con lo anterior, y acorde con lo reportado previamente (Tomasello, Musso, & Cillino, 2016b), al disgregar la muestra en trozos más pequeños en las primeras horas de toma de la muestra, se logra una adecuada separación del tejido limbar y de la esclera, y por lo tanto se facilita y promueve la migración de las células hacia la periferia de la muestra (Figura 11).

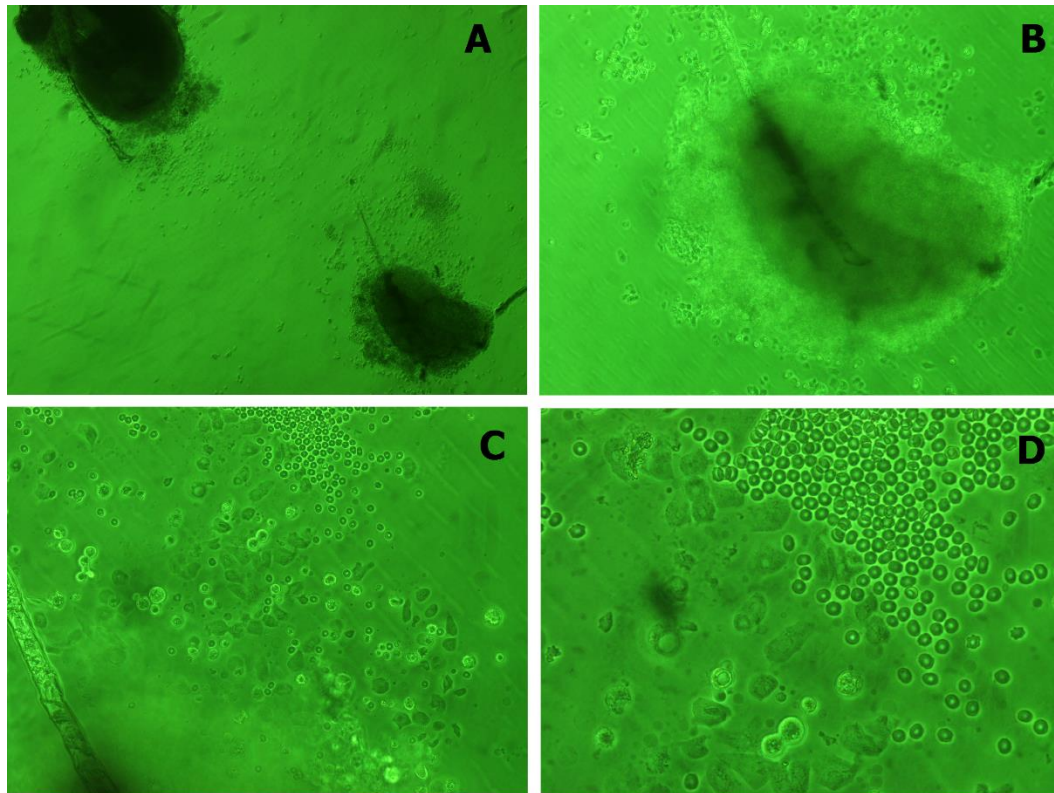


**Figura 11. Tejidos disgregados en proceso de expansión.**

En el presente trabajo identificamos que el tiempo de incubación de la muestra en el medio de cultivo, después de la disgregación mecánica es un aspecto determinante para el crecimiento posterior de las células. Llama la atención que en la literatura revisada, este es un aspecto que no ha recibido la atención que merece. En las muestras procesadas, encontramos grandes diferencias en la expansión y crecimiento de las células de acuerdo al tiempo de incubación de la misma posterior a la disgregación, en donde a mayor tiempo de incubación, mayor adhesión de la muestra al plato de cultivo y mayor expansión de las células en el transcurso de los días. De manera contraria, las muestras que no se incubaron en medio de cultivo, permanecieron flotantes durante varios días en el plato, y la adhesión fue tardía y por ende el crecimiento demoró más en iniciarse. Además se hace mucho más vulnerable a las perturbaciones mecánicas externas, despegándose con facilidad total o parcialmente (algunas de estas muestras se adherían inadecuadamente al plato de cultivo mientras otros pedazos de los tejidos disgregados permanecían flotando). En conclusión, el tiempo de incubación de los tejidos disgregados, en el medio de cultivo, es un factor, y determinante para el cultivo, expansión y para una adhesión exitosa, es decir, en el procesamiento de la muestra y su posterior cultivo, se debe promover siempre la adhesión de las células, tanto al plato de cultivo, como alrededor de la muestra, lo que demuestra



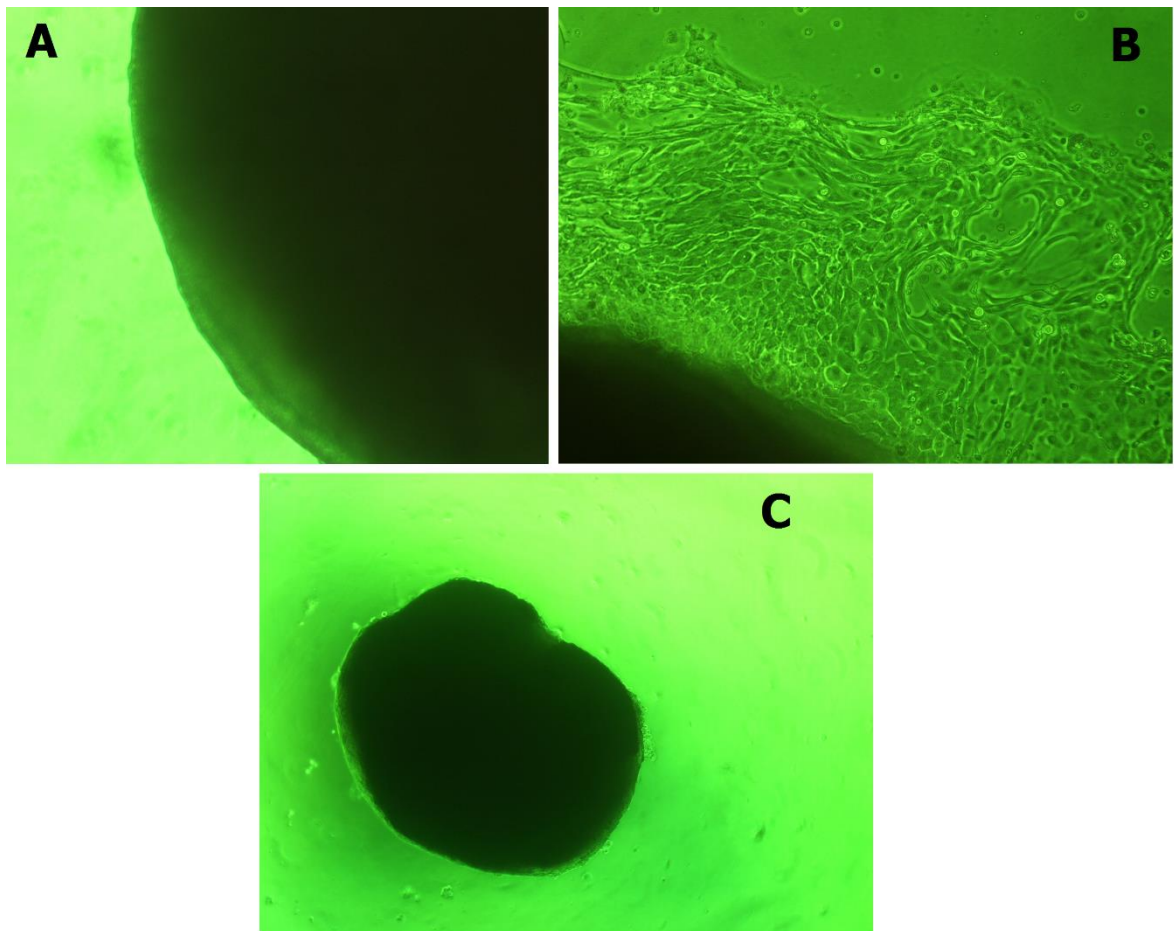
que las células cultivadas dependen de la adhesión por contacto para su crecimiento y desarrollo. Cuando la adhesión es exitosa, se puede observar el progreso del proceso proliferativo a partir del día siguiente al cultivo (Figura 12A). Sin embargo, algunos otros autores indican que este fenómeno se da principalmente en el segundo y el tercer día (Figura 16C) (Mariappan et al., 2010).



**Figura 12. Procesamiento, cultivo y expansión de la muestra de limbo ocular.** A, B. Inicio de la migración celular (día 2 de cultivo). C, D. Proliferación masiva de células de forma circular, lo que se entiende como las células de amplificación transitoria o TACs, las primeras que se dan a partir de las LSCs.

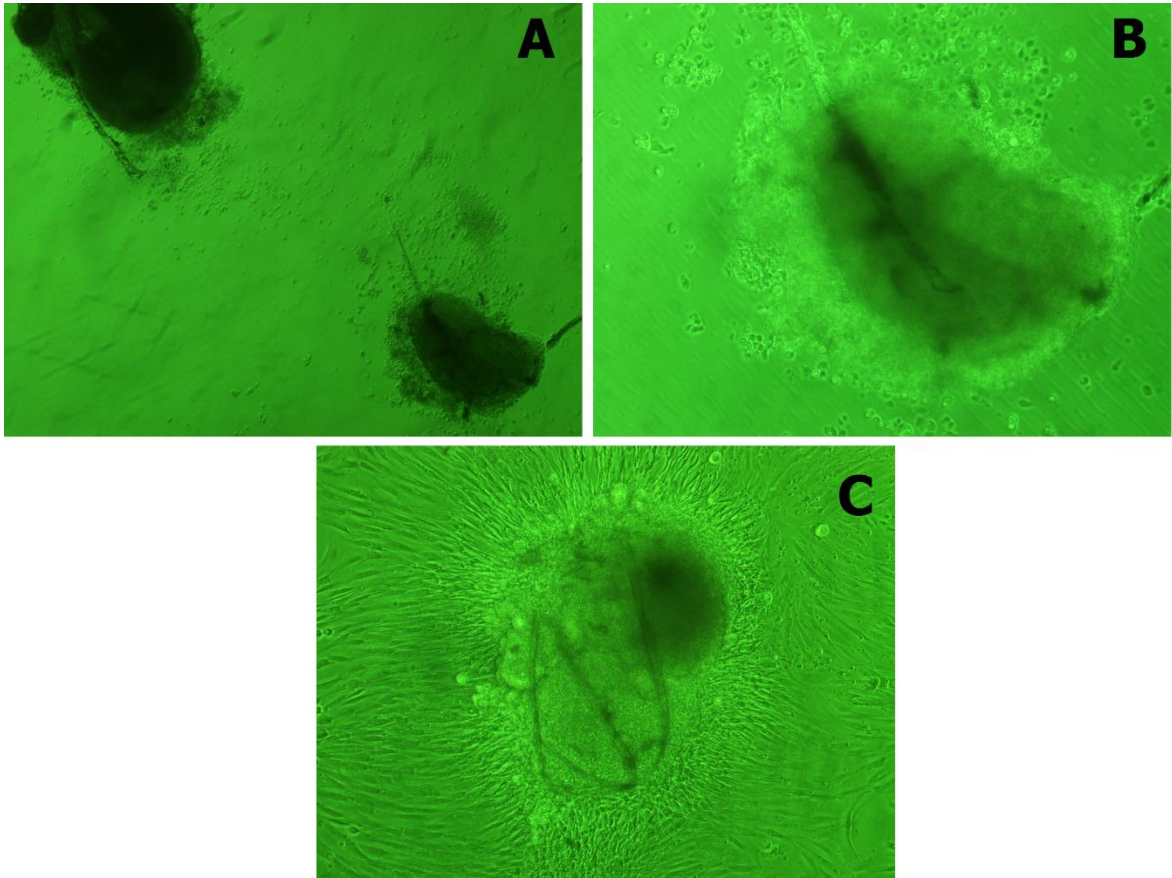
Adicionalmente, se encontró que no sólo es importante el mantener los tejidos disgregados húmedos e hidratados con el medio de cultivo celular, sino que también es necesario que se incluya la periferia de la muestra en la hidratación, de tal forma que no perturbe los pequeños trozos, no los ponga en suspensión, pero que provea la humedad necesaria para que no se deshidraten, dado que hay propensión a la evaporación del medio de cultivo allí presente. Un tejido deshidratado trae como consecuencia pérdida de viabilidad celular.

Al respecto, las muestras que no fueron disgregadas tardaron más tiempo en adherirse al plato y una vez se lograba la adhesión, perturbaciones mecánicas leves desprendían la muestra y por ende las células de la periferia con facilidad, haciendo que el tejido quedara suspendido en el medio de cultivo y sin posibilidad de expandirse como una monocapa que pudiera ser trasplantada (Figura 13) y enlenteciendo el crecimiento de las células que en principio deben crecer adheridas al plato de cultivo.



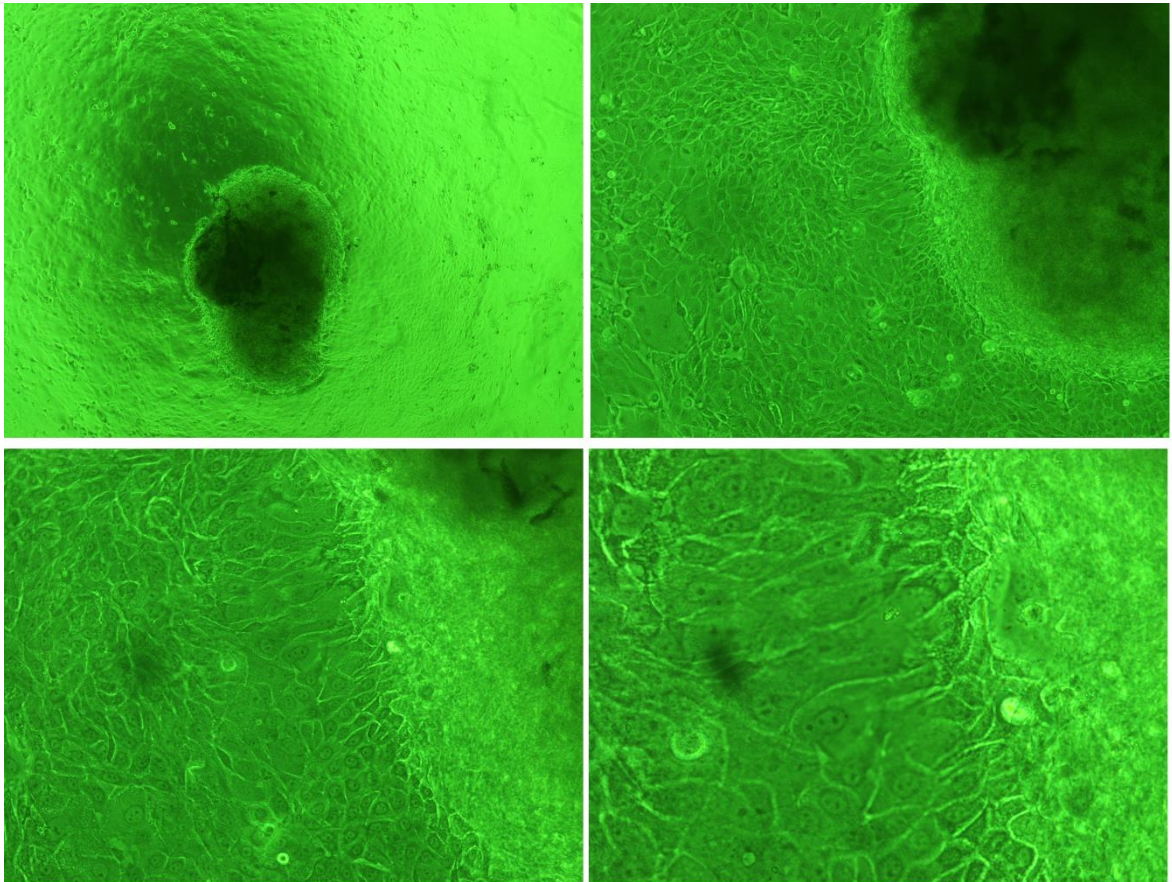
**Figura 13. Ciclo de vida de la muestra sin disgregar en trozos más pequeños.** A. Día 13: el explante está suspendido en el medio y no se observa crecimiento de células en la periferia. B. Día 22: Se observa proliferación celular. C. Día 33: al realizar un pase del cultivo a otro plato se pierde la adhesión de las células y de la muestra.

La adhesión de los tejidos disgregados a la superficie de cultivo se convirtió en un factor de suma importancia en el éxito de estos experimentos porque, en gran parte, de ello depende la velocidad y la eficiencia de proliferación y migración de las células de la muestra hacia el plato. Con respecto al cultivo de las células, en algunas muestras se observó un crecimiento y una confluencia irregular (**Figura 14**), con distribución aleatoria de las células en la superficie del plato de cultivo (**Figura 14B**), en donde se tenían regiones con alta confluencia y otras de baja confluencia (**Figura 14C**).



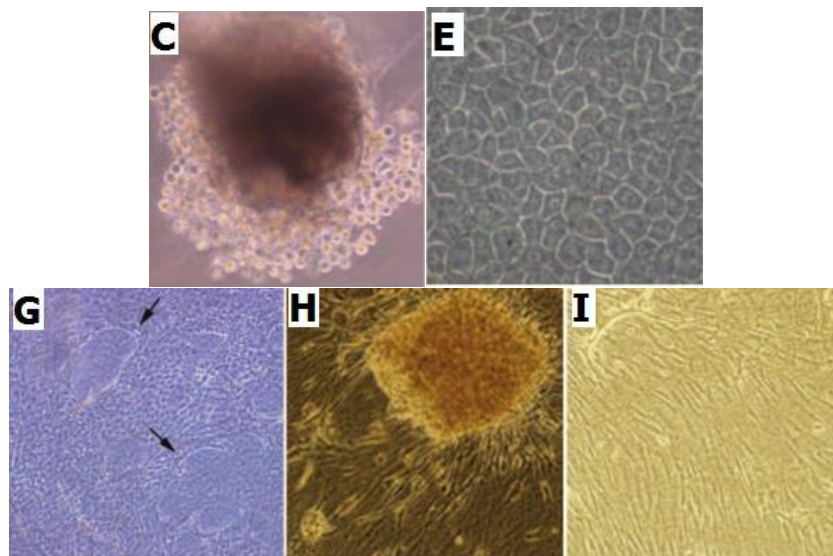
**Figura 14.** Dispersión de las células en cultivo en las primeras etapas de crecimiento.





**Figura 15. Expansión de las células en cultivo.** Muestra en cultivo en el día 13. Para este día el cultivo ya tenía la suficiente confluencia como para ser trasplantado, si ese fuera el caso.

Otros estudios reportaron un crecimiento y una expansión similar a la reportada en este trabajo, con un crecimiento preliminar de las células en la periferia del tejido disgregado (**Figura 16C**), crecimiento posterior en monocapa con una distribución no uniforme (**Figura 16G**) y con expansión a los días del cultivo (**Figura 16I**).



**Figura 16. Cultivo y expansión de las células reportadas en la bibliografía.** **C.** Proliferación de las células migrando hacia la periferia de la muestra en los días 2-3. **E.** Monocapa confluyente de células en los 10 días de cultivo. **G.** Crecimiento no uniforme de las células. **H.** Explante en el que ya solo hay crecimiento de fibroblastos. **I.** En este punto el tejido solo es de queratinocitos estromales. Obtenido de: (Mariappan et al., 2010).

Los cambios de medio se hicieron entre dos y tres veces por semana. A lo largo de la totalidad de experimentos, los componentes del medio y los reactivos utilizados fueron los mismos. Los primeros resultados exitosos en propagación de células epiteliales usando medio suplementado con FBS fueron descritos en 1975 y desde entonces su uso continúa vigente en la investigación (Rheinwald & Green, 1975). El uso de suero autólogo como alternativa al FBS ofrece ventajas bastante significativas porque reduce el riesgo de transmisión de infecciones zoonóticas al evitar el uso de material animal, y evita posibles fuentes de patógenos y de problemas inmunológicos al momento del trasplante al usar tejido del mismo paciente receptor. El suero autólogo tiene además la capacidad de mantener y promover la proliferación de células madre en el proceso de cultivo (Nakamura et al., 2006), se considera adecuado incluir el uso de suero autólogo en etapas posteriores del proyecto. Las condiciones ideales son aquellas que eviten la transmisión de enfermedades, sobre todo cuando se trata de aplicaciones clínicas. Los experimentos del presente trabajo fueron realizados con fines investigativos, y como se acaba de mencionar, en futuras etapas de este proyecto lo mejor es evitar los reactivos de origen animal y cambiar el suero fetal bovino por suero autólogo.

Por su parte, el sustrato de cultivo juega un papel importante en este fenómeno de hidratación y de adhesión, y si bien, en los platos de cultivo que contienen superficie de

plástico modificado se logra una adecuada adhesión, se ha reportado que el uso de sustratos como soporte para la expansión *in vitro* de células de limbo ocular promueven y facilitan el crecimiento de las células (Mariappan et al., 2010). Los autores del presente trabajo consideran que es necesario el incluir un soporte para la siguiente etapa del proyecto. Para esa nueva etapa, y de acuerdo al desarrollo y la evaluación de protocolos por parte de otros autores, en donde generalmente las etapas preliminares de obtención de células madre conllevan a la realización de pruebas inmunohistoquímicas, ensayos proteicos o RT-PCR para evaluar las condiciones a nivel molecular, los autores consideran que si bien este proyecto se constituye en una primera etapa para la obtención y procesamiento de una nueva fuente de células madre, que enriquecerá la experiencia previa del Grupo de Investigación GIBEC en el tema, es necesario que en una nueva etapa se procesa a caracterizar los resultados obtenidos.

## **4 CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES**

Este proyecto de investigación permitió comprobar satisfactoriamente la posibilidad de obtener y expandir células similares morfológicamente a las células madre de limbo ocular a partir de biopsias de tejido limbar. La técnica de cultivo mediante disgregación mecánica y expansión de explantes ha demostrado una proliferación adecuada de las células mediante la adhesión por contacto, tanto desde el tejido disgregado con el plato de cultivo, mediante la hidratación con medio de cultivo, como el crecimiento de las células mediante adhesión por contacto con las células vecinas. De esta primera etapa del trabajo se considera que las células obtenidas a partir de los experimentos realizados tienen el potencial de ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la córnea como lo es la deficiencia limbar por su capacidad de crecimiento y expansión a los 10 días de cultivo.

Esta etapa se constituye en un proyecto preliminar que afianza la experticia de los investigadores del Grupo de Investigación en ingeniería biomédica en cuanto al aislamiento y expansión de células madre de diferentes tipos celulares. Es necesario realizar etapas posteriores para la adecuada caracterización de las células en cultivo. Se sugiere que en la siguiente etapa del proyecto se incluya el cultivo de células con suero autólogo del paciente y sobre una matriz o soporte, preferiblemente de membrana amniótica, que según estudios recientes permite que el tejido disgregado crezca “soportado” y suspendido en un andamiaje natural y propio.

## 5 BIBLIOGRAFÍA

- American Academy of Ophthalmology (AAO). (2013). Estructura y función del exterior del ojo y la córnea. In J. J. Reidy (Ed.), *Enfermedades de superficie ocular y córnea* (pp. 1–8). Elsevier. Retrieved from <http://tienda.elsevier.es/enfermedades-de-superficie-ocular-y-cornea-2011-2012-pb-9788480869850.html>
- American Academy of Ophthalmology (AAO). (2012). *Enfermedades de superficie ocular y córnea 2011-2012*. Elsevier España.
- Ainscough, S. L., Linn, M. L., Barnard, Z., Schwab, I. R., & Harkin, D. G. (2011). Effects of fibroblast origin and phenotype on the proliferative potential of limbal epithelial progenitor cells. *Experimental Eye Research*, 92(1), 10–19. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2010.10.004>
- Arpitha, P., Prajna, N. V., Srinivasan, M., & Muthukkaruppan, V. (2005). High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: Implications on epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(10), 3631–3636. <http://doi.org/10.1167/iov.05-0343>
- Ball, J. W. (2014). Capítulo 11. In J. W. Ball, *Manual Seidel de exploración física* (pp. 204–230). S.A. ELSEVIER ESPAÑA.
- Bowling, B. (2015). Cornea. In B. Bowling, *Kanski's Clinical Ophthalmology* (pp. 167–237). Elsevier.
- Barrandon, Y., & Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(8), 2302–2306. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Basu, S., Hertsensberg, A. J., Funderburgh, M. L., Burrow, M. K., Mann, M. M., Du, Y., ... Funderburgh, J. L. (2014). Human limbal biopsy – derived stromal stem cells prevent corneal scarring. *Science Translational Medicine*, 6(266), 11.
- Bray, L. J., Heazlewood, C. F., Munster, D. J., Hutmacher, D. W., Atkinson, K., & Harkin, D. G. (2016). Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cell cultures derived from the limbus of human and rabbit corneas. *Cytotherapy*, 16(1), 64–73. JOUR. <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.006>
- Chen, S.-Y., Hayashida, Y., Chen, M.-Y., Xie, H. T., & Tseng, S. C. G. (2010). A New Isolation Method of Human Limbal Progenitor Cells by Maintaining Close Association with Their Niche Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(5), 537–548. JOUR. <http://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0609>
- Chen, S.-Y., Mahabole, M., & Tseng, S. C. G. (2013). Optimization of Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Progenitors by Maintaining Native Niche Cells on Denuded Amniotic Membrane. *Translational Vision Science & Technology*, 2(7), 1. <http://doi.org/10.1167/tvst.2.7.1>
- Cotsarelis, G., Cheng, S.-Z., Dong, G., Sun, T.-T., & Lavker, R. M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57(2), 201–209. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90958-6](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90958-6)
- Du, Y., Funderburgh, M. L., Mann, M. M., SundarRaj, N., & Funderburgh, J. L. (2005). Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(9),

- 1266–75. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0256>
- Dua, H. S., Shanmuganathan, V. A., Powell-Richards, A. O., Tighe, P. J., & Joseph, A. (2005). Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *The British Journal of Ophthalmology*, 89(5), 529–32. <http://doi.org/10.1136/bjo.2004.049742>
- Dua, H. S., & Azuara-Blanco, A. (2000). Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. *Survey of Ophthalmology*, 44(5), 415–425. [http://doi.org/10.1016/S0039-6257\(00\)00109-0](http://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00109-0)
- Dua, H. S., & Forrester, J. V. (1990). The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *American Journal of Ophthalmology*, 110(6), 646–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2248329>
- Dua, H. S., Joseph, A., Shanmuganathan, V. A., & Jones, R. E. (2003). Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (London, England)*, 17(8), 877–85. <http://doi.org/10.1038/sj.eye.6700573>
- Dua, H. S., Saini, J. S., Azuara-Blanco, A., & Gupta, P. (2000). Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian Journal of Ophthalmology*, 48(2), 83–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116520>
- Durán de la Colina, J. (2014). ARCHIVOS DE LA SOCIEDAD CANARIA DE OFTALMOLOGÍA. Obtenido de La superficie ocular: <http://www.oftalmo.com/seo/archivos/maquetas/1/70CDFB46-4D23-32E8-AA68-000026EBCCD1/articulo.html>
- Dziasko, M. A., Armer, H. E., Levis, H. J., Shortt, A. J., Tuft, S., & Daniels, J. T. (2014). Localisation of epithelial cells capable of holoclone formation in vitro and direct interaction with stromal cells in the native human limbal crypt. *PLoS ONE*, 9(4), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094283>
- Dziasko, M. A., & Daniels, J. T. (2016). Anatomical Features and Cell-Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche. *The Ocular Surface*, 14(3), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jtos.2016.04.002>
- Ebato, B., Friend, J., & Thoft, R. A. (1988). Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(10), 1533–1537. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Echevarria, T. J., Chow, S., Watson, S., Wakefield, D., & Di Girolamo, N. (2011). Vitronectin: A matrix support factor for human limbal epithelial progenitor cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(11), 8138–8147. <http://doi.org/10.1167/iovs.11-8140>
- Espana, E. M., Kawakita, T., Romano, A., Di Pascuale, M., Smiddy, R., Liu, C. Y., & Tseng, S. C. G. (2003). Stromal Niche Controls the Plasticity of Limbal and Corneal Epithelial Differentiation in a Rabbit Model of Recombined Tissue. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(12), 5130–5135. <http://doi.org/10.1167/iovs.03-0584>
- Fatima, A., Sangwan, V., Iftekhar, G., Reddy, P., Matalia, H., Balasubramanian, D., & Vemuganti, G. K. (2006). Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J Postgrad Med*, 52(4), 257–261. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/pdf?jp06090>

- Fortier, L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery: VS*, 34(5), 415–423. Journal Article, Review. <http://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>
- Funderburgh, J. L., Funderburgh, M. L., & Du, Y. (2016). Stem Cells in the Limbal Stroma. *The Ocular Surface*, 14(2), 113–120. <http://doi.org/10.1016/j.jtos.2015.12.006>
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2001). In *Texto Atlas de Histología* (Segunda ed., p. 488). Philadelphia: McGraw-Hill Interamericana.
- Ginel Gascon, M. I. (2008). *Desarrollo del sistema de cohesión intercelular en el epitelio corneal humano generado por ingeniería tisular. Estudio genético e histológico*. Universidad de Granada.
- Gaddipati, S., Sangwan, V. S., Basu, S., Vemuganti, G. K., Ramappa, M., & Maddileti, S. (2014). Xeno-Free Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Bilateral Ocular Surface Burns: Clinical Outcomes and Immunohistochemical Analysis. *Current Indian Eye Research*, 1(1), 17–24.
- Garralda, A., Epelde, A., Iturralde, O., Compains, E., Maison, C., & Altarriba, M. (2006). Trasplante de córnea Cornea transplant, 29, 163–174.
- Geerling, G., MacLennan, S., & Hartwig, D. (2004). Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *The British Journal of Ophthalmology*, 88(11), 1467–1474. <http://doi.org/10.1136/bjo.2004.044347>
- Grueterich, M., Espana, E. M., & Tseng, S. C. G. (2003). Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: Amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Survey of Ophthalmology*, 48(6), 631–646. <http://doi.org/10.1016/j.survophthal.2003.08.003>
- Hashmani, K., Branch, M. J., Sidney, L. E., Dhillon, P. S., Verma, M., McIntosh, O. D., ... Dua, H. S. (2013). Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 75. <http://doi.org/10.1186/scrt226>
- Hernandez Galindo, E. E., Theiss, C., Steuhl, K. P., & Meller, D. (2003). Expression of p63 in response to phorbol ester in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(7), 2959–2965. <http://doi.org/10.1167/iovs.02-0776>
- Homma, R., Yoshikawa, H., Takeno, M., Kurokawa, M. S., Masuda, C., Takada, E., ... Suzuki, N. (2004). Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(12), 4320–4326. <http://doi.org/10.1167/iovs.04-0044>
- Huang, M., Wang, B., Wan, P., Liang, X., Wang, X., Liu, Y., ... Wang, Z. (2015). Roles of limbal microvascular net and limbal stroma in regulating maintenance of limbal epithelial stem cells. *Cell and Tissue Research*, 359(2), 547–563. article. <http://doi.org/10.1007/s00441-014-2032-4>
- Katikireddy, K. R., Dana, R., & Jurkunas, U. V. (2014). Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(3), 717–29. <http://doi.org/10.1002/stem.1541>
- Kenyon, K. R., & Tseng, S. C. (1989). Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 96(5), 703–709. Case Reports, Journal Article.



- Kruse, F. E., & Tseng, S. C. G. (1994). Retinoic acid regulates clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35(5), 2405–2420.
- Kurpakus, M. A., Stock, E. L., & Jones, J. C. (1990). Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31(3), 448–456. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/>
- Lavker, R. M., Dong, G., Cheng, S. Z., Kudoh, K., Cotsarelis, G., & Sun, T. T. (1991). Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(6), 1864–1875. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/>
- Lehrer, M. S., Sun, T. T., & Lavker, R. M. (1998). Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 1, 2867–2875. Journal Article, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Li, G.-G., Zhu, Y.-T., Xie, H.-T., Chen, S.-Y., & Tseng, S. C. G. (2012). Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9), 5686–97. <http://doi.org/10.1167/iovs.12-10300>
- Li, W., He, H., Kuo, C.-L., Gao, Y., Kawakita, T., & Tseng, S. C. G. (2006). Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(6), 2381–9. <http://doi.org/10.1167/iovs.05-1491>
- Limeng, Y., Dan, J., Jia, H., & David, S. (2014). Limbal Stem Cells and Corneal Epithelial Regeneration: Current Status and Prospectives. *Journal of Ocular Biology*.
- Lindberg, K., Brown, M. E., Chaves, H. V, Kenyon, K. R., & Rheinwald, J. G. (1993). In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34(9), 2672–2679. Comparative Study, Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Mariappan, I., Maddileti, S., Savy, S., Tiwari, S., Gaddipati, S., Fatima, A., ... Vemuganti, G. K. (2010). In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nature Protocols*, 5(8), 1470–9. <http://doi.org/10.1038/nprot.2010.115>
- Mathews, S., Chidambaram, J. D., Lanjewar, S., Mascarenhas, J., Prajna, N. V., Muthukkaruppan, V., & Chidambaranathan, G. P. (2015). In Vivo Confocal Microscopic Analysis of Normal Human Anterior Limbal Stroma. *Cornea*, 34(4). JOUR. Retrieved from [http://journals.lww.com/corneajrnl/Fulltext/2015/04000/In\\_Vivo\\_Confocal\\_Microscopic\\_Analysis\\_of\\_Normal.19.aspx](http://journals.lww.com/corneajrnl/Fulltext/2015/04000/In_Vivo_Confocal_Microscopic_Analysis_of_Normal.19.aspx)
- Mei, H., Gonzalez, S., & Deng, S. X. (2012). Extracellular Matrix is an Important Component of Limbal Stem Cell Niche. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(4), 879–94. <http://doi.org/10.3390/jfb3040879>
- Mei, H., Nakatsu, M. N., Baclagon, E. R., & Deng, S. X. (2014). Frizzled 7 maintains the undifferentiated state of human limbal stem/progenitor cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(4), 938–45. <http://doi.org/10.1002/stem.1582>
- Mejía, L. F. (2014). *Biblioteca Oftalmológica*. Obtenido de Luis Fernando Mejía E. Oftalmólogo: [http://www.lfmejia.com/pagina\\_interna/trasplante-corneal-biblioteca](http://www.lfmejia.com/pagina_interna/trasplante-corneal-biblioteca)
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Ang, L. P. K., Koizumi, N., Yokoi, N., & Kinoshita,



- S. (2006). Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology*, 113(10), 1765–72. <http://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.04.030>
- Osei-Bempong, C., Figueiredo, F. C., & Lako, M. (2013). The limbal epithelium of the eye-- a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 35(3), 211–9. <http://doi.org/10.1002/bies.201200086>
- Pineda Molina, C., & Giraldo Hoyos, J. (2012). *Comparación de fuentes de células madre adultas: eficiencia de proliferación y potencial de diferenciación*. Escuela de Ingeniería de Antioquia.
- Pellegrini, G., Golisano, O., Paterna, P., Lambiase, a, Bonini, S., Rama, P., & De Luca, M. (1999). Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 769–782. <http://doi.org/10.1083/jcb.145.4.769>
- Rodríguez Martín, J., Martín Barrera, F., Arteaga Hernández, V., Abreu Reyes, J., Aguilar Estévez, J., & González de la Rosa, M. (2003). Transplante de limbo en patología de la superficie ocular. *Arch Soc Canar Oftal, Epub* 14, 71–76. Retrieved from <http://www.oftalmo.com/sco/revista-14/14sco12.htm>
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., & Pellegrini, G. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England Journal of Medicine*, 363(2), 147–155. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0905955>
- Rheinwald, J., & Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 3, 331–343.
- Reinhard, T., & Larkin, F. (2010). Cornea and External Eye Disease: Corneal Allotransplantation, Allergic Disease and Trachoma. En S. T. Alex Shortt, *Chapter 5: Limbal stem cell transplantation: surgical techniques and results* (págs. 53-61). Springer Science & Business Media.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Schermer, A., Galvin, S., & Sun, T. T. (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *The Journal of Cell Biology*, 103(1), 49–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2113783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Scorsetti, D. H. (2014). *Asociación Latinoamericana de Cirujanos de Catarata, Segmento anterior y Refractiva*. Retrieved from Stem Cells en la Superficie Ocular: <http://www.alacssa.com/stem-cells-en-la-superficie-ocular/>
- Secker, G. A., & Daniels, J. T. (2009, June 30). Limbal epithelial stem cells of the cornea. Harvard Stem Cell Institute. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27054/>
- Sejpal, K., Ali, M. H., Maddileti, S., Basu, S., Ramappa, M., Kekunnaya, R., ... Sangwan, V. S. (2013). Cultivated limbal epithelial transplantation in children with ocular surface burns. *JAMA Ophthalmology*, 131(6), 731–6. <http://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.2308>
- Sejpal, K., Bakhtiari, P., & Deng, S. (2013). Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East African Journal of Ophthalmology*.

<http://doi.org/10.4103/0974-9233.106381>

- Shortt, A. J., Secker, G. A., Munro, P. M., Khaw, P. T., Tuft, S. J., & Daniels, J. T. (2007). Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(6), 1402–9. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0580>
- Schlötzer-Schrehardt, U., & Kruse, F. E. (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Experimental Eye Research*, 81(3), 247–64. <http://doi.org/10.1016/j.exer.2005.02.016>
- Thoft, R., Friend, J., Jm, E., E, A., F, F., E, G., ... G, V. (1983). The X , Y , Z Hypothesis of Comeol Epitheliol Mointenonce To the Editor : For the past few years , studies of corneal epithelial of corneal epithelial disease . Department of Ophthalmology. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(October), 1442–1443.
- Tomasello, L., Musso, R., & Cillino, G. (2016a). Donor age and long-term culture do not negatively influence the stem potential of limbal fibroblast-like stem cells. *Cell Research & ...*, 1–14. <http://doi.org/10.1186/s13287-016-0342-z>
- Tomasello, L., Musso, R., & Cillino, G. (2016b). Donor age and long-term culture do not negatively influence the stem potential of limbal fibroblast-like stem cells. *Cell Research & ...*, 1–14. <http://doi.org/10.1186/s13287-016-0342-z>
- Tsai, R. J., Sun, T. T., & Tseng, S. C. (1990). Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology*, 97(4), 446–455. JOUR. [http://doi.org/10.1016/s0161-6420\(90\)32575-7](http://doi.org/10.1016/s0161-6420(90)32575-7)
- Tseng, S. C. G., Chen, S.-Y., Shen, Y.-C., Chen, W.-L., & Hu, F.-R. (2010). Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Current Molecular Medicine*, 10(9), 841–50. <http://doi.org/10.2174/156652410793937796>
- Tseng, S. C., & Zhang, S. H. (1995). Limbal epithelium is more resistant to 5-fluorouracil toxicity than corneal epithelium. *Cornea*, 14(4), 394–401. Journal Article, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Tseng, S. C. G., He, H., Zhang, S., & Chen, S.-Y. (2016). Niche Regulation of Limbal Epithelial Stem Cells: Relationship between Inflammation and Regeneration. *The Ocular Surface*, 14(2), 100–12. <http://doi.org/10.1016/j.jtos.2015.12.002>
- Vemuganti, G. K., Kashyap, S., Sangwan, V. S., & Singh, S. (2004). Ex-vivo potential of cadaveric and fresh limbal tissues to regenerate cultured epithelium. *Indian Journal of Ophthalmology*, 52(2), 113–20. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/8427157\\_Ex-vivo\\_potential\\_of\\_cadaveric\\_and\\_fresh\\_limbal\\_tissues\\_to\\_regenerate\\_cultured\\_epithelium](http://www.researchgate.net/publication/8427157_Ex-vivo_potential_of_cadaveric_and_fresh_limbal_tissues_to_regenerate_cultured_epithelium)
- Villa, C., & Santodomingo, J. (2009). La córnea. Parte I Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta Óptica*.
- Welsch, U. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Xie, H.-T., Chen, S.-Y., Li, G.-G., & Tseng, S. C. G. (2011). Isolation and Expansion of Human Limbal Stromal Niche Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, (305). <http://doi.org/10.1167/iov.11-8441>
- Zhao, Y., & Ma, L. (2015). Systematic Review and Meta-analysis on Transplantation of Ex Vivo Cultivated Limbal Epithelial Stem Cell on Amniotic Membrane in Limbal Stem Cell

Deficiency. Retrieved March 26, 2015, from <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.15.1b/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=FKNKFPGHAJDDLOBNCKKHELBIEBEAA00&returnUrl=ovidweb.cgi?Main+Search+Page=1&S=FKNKFPGHAJDDLOBNCKKHELBIEBEAA00&directlink=http://graphics.tx.ovid.com/ovftpdfs/FPDDNCL>

## ANEXOS

### ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Ciudad: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_  
Yo \_\_\_\_\_ con  
Cédula de ciudadanía No. \_\_\_\_\_, he sido informado por el Dr.  
\_\_\_\_\_ de la naturaleza, objetivos y características del estudio  
denominado “**Protocolo de obtención de células epiteliales de limbo en humanos**” para  
el cual cumpla con los requisitos de participación dadas mis condiciones de salud, y acepto  
participar voluntariamente en él.

Entiendo que toda la información personal recolectada será mantenida bajo estricta  
confidencialidad, usada con fines científicos y manejada con responsabilidad. En ninguna  
parte del informe final de la investigación aparecerá mi nombre o cualquier información que  
permita mi identificación personal.

Acepto que se utilice la biopsia contralateral de tejido limbar extraída durante el  
procedimiento quirúrgico al que por razones de mi salud personal seré sometido, por el  
médico cirujano \_\_\_\_\_. Confío y  
acepto que la utilización de este tejido no tendrá ningún riesgo de infección, cicatriz o  
sangrado, así mismo entiendo y conozco cuales pueden ser las complicaciones de una  
cirugía como la que me será practicada.

Informo que no me ha sido prometido ninguna remuneración en dinero o en especie por mi  
participación, y que no recibiré ningún pago ni tendré que pagar ningún dinero por los  
estudios o pruebas a las que sean sometidas mis muestras.

Finalmente, declaro que he sido informado de que mi participación es voluntaria y puedo  
retirarme del estudio en el momento que lo considere pertinente, sin que eso afecte el  
derecho a ser atendido o recibir tratamiento alguno por parte de los profesionales de la  
salud que conocen o atienden mi caso.

Para constancia,

Firma \_\_\_\_\_ CC: \_\_\_\_\_

Firma del Investigador \_\_\_\_\_ CC: \_\_\_\_\_

Firma del Testigo \_\_\_\_\_ CC: \_\_\_\_\_

## **ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

### **Protocolo producción del suero autólogo del paciente**

Materiales, reactivos y equipos

3 tubos vacuette con suero activador de coagulación.

3 Tubos falcon de 50 ml

Material de sangrado.

Pipetas.

Micropipeteador.

Centrífuga.

### **Procedimiento**

1. Tomar 4 ml de sangre intravenosa en tres tubos Vacuette con suero activador de coagulación.
2. Dejar coagular la muestra a temperatura ambiente durante una hora.
3. Transportar la muestra al Laboratorio de Biotecnología en salud
4. Una vez en el Laboratorio, centrifugar la muestra a temperatura ambiente, 15 minutos y 1.250g para la separación del suero.
5. Pipetear el sobrenadante (que contiene el suero) en un tubo Falcon de 50 ml.

*Nota:* de una muestra de 12 ml de sangre se puede obtener aproximadamente 5 ml de suero, y con el mismo se pueden preparar 50 ml de medio HCE (suero al 10%), lo que puede ser suficiente para 2-3 semanas de mantenimiento del cultivo.

### **PBS (solución 1X)**

- Disolver el Tampón Fosfato Salino (PBS; Sigma, cat. no. D5652; para 1 litro) en 900 ml de Agua Mili-Q
- Ajustar el pH a 7.2 con NaOH o HCl 1 N mientras se agita.
- Ajustar el volumen final a 1 L con agua Milli-Q
- Esterilizar usando autoclave.
- Almacenar a 4 °C hasta por 1 semana.

### **L-Glutamina (solución stock de 200 mM)**

- Reconstituir un vial de L-Glutamina (Sigma, cat. no. G6392) con 10 ml de PBS.
- Filtro-esterilizar con un filtro de jeringa de 0,22 µm (de baja unión proteica) y almacenar a 4 °C para su uso en 1 semana o a -20 ° C para un máximo de 6 meses.

**EGF (*Epidermal Growth Factor*) recombinante humano (solución stock 20 µg/ml)**

- Preparar solución de PBS 1X con 0,1% (wt/vol) de BSA.
- Filtro-esterilizar utilizando un filtro de jeringa de 0,22 µm.
- Reconstituir un vial de 200 µg de EGF recombinante humano (Sigma, cat. no. G6392) en 10 ml de PBS estéril con el 0.1% de BSA.
- Preparar alícuotas de 200 µl y almacenar a -20 °C durante un máximo de 6 meses.

**Insulina recombinante humana (solución stock 2,000X; 10 mg/ml)**

- Preparar solución de HCl al 1% (vol/vol)
- Filtro-esterilizar con filtro de jeringa de 0,22 µm.
- Reconstituir un vial de 50 mg de insulina recombinante humana (Sigma, cat. no. I2643) en 5 ml de solución de HCl al 1%.
- Preparar alícuotas de 200 µl y almacenar a -20 °C durante un máximo de 6 meses.

**Protocolo para la elaboración del medio de crecimiento de epitelio corneal (HCE)**

**Materiales y reactivos**

1.99 g de Minimal essential medium (MEM).  
3.33 g de Ham's F12.  
50µl (0,01 mg/L) de factor de crecimiento epidérmico.  
50µl (0,1 mg/L) de toxina colérica.  
2,5 a 5 mg de insulina.  
0,69 gr de bicarbonato de sodio.  
*10% de suero autólogo.*  
*75 mg de penicilina.*  
*50 mg de estreptomicina.*  
*1.25 mg de amfotericina.*  
*50µl (4 mg/L) de gentamicina.*

Filtro de 0,22 µm.  
Jeringa para el filtro.  
Micropipetas.  
Puntas para micropipetas.  
Balanza analítica.

**Procedimiento**

1. Filtrar la solución utilizando el filtro de 0,22 µm.

2. Rotular y almacenar a 4°C.

Nota: el suero y los antibióticos se pueden adicionar en el momento de uso para que el medio pueda almacenarse durante más tiempo.

### **Otra opción del medio de cultivo**

#### **Materiales, reactivos y equipos**

84% 1:1 DMEM y Ham F12.

16% fetal bovine serum.

100 U/ml Penicillin-Streptomycin and amphotericin B.